

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR MICROSSATÉLITES
DE PASSIFLORAS SILVESTRES DO BAG - UESC, ILHÉUS -
BAHIA**

MARLA ARIANNE ALMEIDA SILVA

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Março de 2010

MARLA ARIANNE ALMEIDA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR MICROSSATÉLITES DE PASSIFLORAS
SILVESTRES DO BAG – UESC, ILHÉUS –BAHIA.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Março de 2010

S586

Silva, Marla Arianne Almeida.

Caracterização molecular por microssatélites de passifloras
Silvestres do BAG – UESC, Ilhéus – Bahia / Marla Arianne
Almeida Silva. – BA: UESC 2010.

xi, 84 f. : il.

Orientadora: Margarete Magalhães de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa
Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.
Referências: f. 63-84.

1. Microssatélites (Genética). 2. Passiflora. 3. Passiflorácea.
4. Marcadores genéticos. 5. Plantas – Melhoramento genético.
6. Genética vegetal. 7. Plantas ornamentais. I. Título.

CDD 572.8633

MARLA ARIANNE ALMEIDA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR MICROSSATÉLITES DE PASSIFLORAS
SILVESTRES DO BAG - UESC, ILHÉUS -BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 03 de Março de 2010.

Profa. Dra. Ioná dos Santos Araújo
(UFERSA/ UESC)

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida
(UESC)

Prof. Dr. Roberto Lisboa Romão
(UEFS)

Profa. Dra. Antônia Marlene Magalhães
Barbosa.
(UESC)

Profa. Dra. Margarete Magalhães de Souza
(UESC – Orientadora)

A DEUS, aos meus pais, Djalma dos Reis e Marizeth Almeida, e a toda a minha família pelo amor, apoio e por acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que não acreditei.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

É com muita emoção e satisfação que finalizo mais uma etapa da minha jovem vida profissional, mas considero que nada disso teria se concretizado sem a ajuda de algumas pessoas, por isso agradeço:

A Deus, pois senti sua presença em todos os momentos durante a execução deste trabalho;

À minha mãe, Marizeth Almeida Silva (essa parte é difícil), por tudo o que sou tudo o que conquistei, pelas longas conversas de estímulo, pelo exemplo de determinação e pela acolhida na hora da volta para casa;

Ao meu pai, Djalma dos Reis e Silva, pelos ensinamentos sobre a vida, pelos empurrões nas incertezas, pelo apoio nas horas difíceis, e embora ele não saiba é o meu orgulho, o meu exemplo é o meu “negão”;

À minha irmã, Djamara Almeida Silva, pelas longas conversas ao telefone, pelo incentivo quando o *primer* não amplificava, mesmo não sabendo quem era o *primer*, e principalmente pelo estímulo “pós” defesa.

À minha orientadora, Margarete Magalhães de Souza, por me ensinar a fazer pesquisa contribuindo de forma inesquecível para a minha formação;

À minha comissão de orientação, Dr. Ronan Xavier Corrêa e Dr. Léo Duc Haa Carson Schwartzaupt da Conceição pela ajuda na obtenção e análise dos resultados;

A todos os meus familiares que sonharam junto comigo para a consolidação desse sonho;

A todos os meus amigos do Piauí, em especial Michelle Araújo, que confiaram em mim e que fizeram falta nas horas mais difíceis;

Às minhas irmãs de pesquisa e amigas, Pablíane Lawinsky, Priscilla Abreu e Gabriela Belo por todos os momentos vividos, sejam eles descontraídos ou tensos;

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular Aplicada e Citogenética, Elaine, Gisa, Mariana, Claudine, Jeiza, Ivandilson, Olívia, Vanderly, Kátia, Cintia pelas

experiências trocadas, pelas dúvidas resolvidas, pelas conversas agradáveis e por deixar o ambiente de trabalho mais produtivo;

A todos os meus colegas de mestrado e doutorado do Programa de Pós – graduação em Genética e Biologia Molecular pelas angústias e conquistas compartilhadas;

A Kátia Manuela, Daniel Luz e Daniel Luz Filho por me acolherem no seu lar e pelo convívio saudável durante esses dois anos;

Aos amigos que conquistei, na Bahia, de Minas Gerais e até mesmo do Paraná, agradeço a compreensão nas horas as quais não pude estar presente;

À UESC, pela infra-estrutura concedida;

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade e participação efetiva durante o andamento do curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

Aos pesquisadores Dr. Luís Carlos Bernacci e Dr. Armando Carlos Cervi pela identificação taxonômica do material botânico utilizado, e ao Dr. Vitor Osmar Becker, pela permissão de coleta na reserva RPPN Serra Bonita, Camacan, Bahia.

Aos membros da banca pela avaliação crítica e valiosa que contribuiu para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

“A vida é mais simples do que a gente pensa. Basta aceitar o impossível, dispensar o indispensável e suportar o intolerável”

Kathleen Norris

SUMÁRIO

EXTRATO	viii
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. O gênero Passiflora	5
2.2. A importância econômica do gênero.....	8
2.3. Bancos de Germoplasma	10
2.3.1. Caracterização molecular e Germoplasma.....	14
2.4. Marcadores Microssatélites.....	16
2.4.1. Aspectos Gerais.....	16
2.4.1. Transferibilidade de primers microssatélites.....	20
2.4.3. Aplicação dos SSRs na caracterização de bancos de germoplasma.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Material Vegetal.....	25
3.2. Extração e Quantificação de DNA genômico.....	27
3.3. Marcadores microssatélites	27
3.3.1. <i>Primers</i> e ampliações via PCR.....	27

3.3.2. Testes de transferibilidade e detecção dos fragmentos amplificados.....	35
3.4. Estimativa da Genética Descritiva.....	35
3.5. Análise da variabilidade intraespecífica de <i>P. alata</i>	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Taxa de transferibilidade de <i>primers</i> microsatélites.....	37
4.2. Caracterização dos locos de <i>Passiflora</i> utilizados.....	42
4.3. Caracterização das espécies.....	46
4.4. Análise da variação intraespecífica de <i>P. alata</i>	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	63

EXTRATO

SILVA, Marla Arianne Almeida, M. S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Março de 2010. **Caracterização molecular por microssatélites de Passifloras silvestres do BAG – UESC, Ilhéus -BAHIA.** Orientadora: Margarete Magalhães de Souza. Co-orientadores: Ronan Xavier Corrêa e Leo Duc Haa Carson S. da Conceição.

O gênero *Passiflora* L. é o mais representativo da família Passifloraceae, com mais de 500 espécies conhecidas, das quais cerca de 150 a 200 são originárias do Brasil. Grande parte das espécies apresenta flores exóticas e com enorme variabilidade de cores, agregando grande valor ornamental. A conservação *ex situ* em Banco Ativo de Germoplasma (BAG) permite manter e garantir a disponibilidade de genótipos aos programas de melhoramento genético. A UESC detém um BAG-Passifloras que abriga várias espécies silvestres de *Passiflora* que podem ser utilizadas para este propósito e necessita de estudos que acessem a sua diversidade genética. Este estudo teve como objetivo caracterizar os acessos de seis espécies de *Passiflora* silvestres (*P. alata*, *P. cacaoensis*, *P. cincinnata*, *P. glandulosa*, *P. gibertii* e *P. mucronata*) mantidas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Passifloras) da UESC, utilizando 31 *primers* microssatélites dentre aqueles previamente desenvolvidos para *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* e para *P. alata*. Para as análises de transferência dos *primers* foram utilizados quatro acessos de cada espécie. As amplificações, cujos resultados foram visíveis em eletroforese em gel de agarose a 2,5% foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. A partir dos dados

gerados foram estimados parâmetros genéticos de diversidade com o auxílio do programa GDA versão 1.0. A taxa de amplificação variou de 0 a 87,7% e para os *primers* analisados e, dentro das espécies *P. alata* (47,3%) e *P. cacaoensis* (45,5%) apresentaram maiores taxas de transferibilidade. As análises de diversidade genética foram realizadas nos grupos de espécies separadamente. Os locos A06FP1 e pe27 exibiram cinco alelos por loco (A), quando observados no grupo de espécies de *P. alata*, sendo esse o maior valor apresentado para este parâmetro. Os locos analisados obtiveram PIC que variaram de 0 a 1 e os valores das heterozigosidades observadas foram maiores do que as esperadas em todos os locos, evidenciando excesso de heterozigotos. Os índices de diversidade intrapopulacional, F_{IS} , variaram de -1 a 0,57. A espécie que apresentou maior número de alelos por loco (A) foi *P. alata* (3,33), provavelmente devido à maior quantidade de indivíduos amostrados para espécie. Apesar de algumas espécies exibirem altos valores de PIC (0,83 e 0,85), para a maioria das espécies esses valores não seguiram o mesmo perfil, apresentando PIC de 0,5 a 0,2, considerados moderadamente e pouco informativos, respectivamente, podendo estar subestimados devido ao pequeno número de indivíduos nas espécies analisadas. Grupos de espécies apresentaram valores de F_{IS} negativos, exceto *P. cincinnata* (0,57), demonstrando que há excesso de homozigotos para esta espécie. Esses parâmetros de diversidade genética podem ter sido influenciados diretamente pelo pequeno tamanho amostral das espécies estudadas. O estudo intraespecífico dos acessos de *P. alata* exibiu elevada similaridade genética entre os indivíduos, com valores que variaram de 0,47 a 1,00 e similaridade média de 0,74. Portanto esse estudo evidenciou a verdadeira variabilidade genética intraespecífica presente BAG-Passifloras da UESC e conduzirá para que novas estratégias de amostragem sejam adotadas, para aumentar a representabilidade das espécies.

Palavras-chave: Ornamentação, marcadores microssatélites, diversidade genética, recursos genéticos vegetais.

ABSTRACT

SILVA, Marla Arianne Almeida, M. S. Universidade Estadual de Santa Cruz Ilhéus, march of 2010. **Molecular characterization by microsatellites of wild Passifloras of the BAG - UESC, Ilhéus -BAHIA.** Advisor: Margarete Magalhães de Souza. Advisor Committee Members: Ronan Xavier Corrêa and Leo Duc Haa Carson S. da Conceição.

The genus *Passiflora* L. is most representative of the Passifloraceae family, with 500 known species of which about 150 to 200 are originary of Brazil. The majority the of species exhibit exotic flowers and with enormous colors variability, adding great ornamental value. The conservation *ex situ* in Bank of Germplasma allows to keep and guarantee the availability of materials to the programs of genetic improvement. The Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) to keep banks of germplasma - Passifloras that shelters some wild species of *Passiflora* that can be used for this intention and needs studies to access its genetic diversity. This study aim to characterize the six wild species of *Passiflora* (*P. alata*, *P. cacaoensis*, *P. cincinnata*, *P. glandulosa*, *P. gibertii* and *P. mucronata*) kept in the Active Bank of Germplasma (BAG-Passifloras) of UESC, using thirty one markers microsatellites previously developed for *Passiflora edulis* Sims *f. flavicarpa* and for *P. alata*. For analisis the transferability of the *primers* had been used four individuals of each species. The amplification that had resulted in products visible in 2,5% agarose gels eletroforese had been analyzed by 6% silver-stained polyacrylamide gels. Genetic data diversity

had been gotten with the aid of program GDA version 1.0. Amplification success varied of 0 the 87,7% and the species, *P. alata* (47,3%) and *P. cacaoensis* (45,0%) had presented greater transferability. The analysis of genetic diversity had been carried inside of the groups of each species. Loci A06FP1 and pe27 had shown five alleles for locus (A), in the group of species of *P. alata*, being the value greater presented for this parameter. The analyzed loci had gotten PIC varying of 0 the 1, the values of the observed heterozygosity (HO) had been bigger of what expected in all the loci, evidencing excess of heterozygotes. The index of intrapopulational diversity (FIS), exhibit of -1 the 0,57 values. The species that show greater number of alleles for locus (A) was *P. alata* (3,33), probably due to had the biggest amount of individuals among the group of species. Although some species to show high values of PIC (0,83 and 0,85) for the majority of the species these values had not followed profile (0,5 - 0,2) considered moderately and little informative, however this index cannot to be exhibit their true values due to the small number of individuals in the species analyzed. Groups of species had presented negative values of F_{IS} , except *P. cincinnata* (0,57) demonstrate excess of homozygotes to this specie. These parameters of genetic diversity can be being influenced by the small size of de individuals of the studied species, not representing the true potential of the marker used as well as the existing diversity in these species. The intraespecífico study of the accesses of *P. alata* showed high genetic similarity between the individuals, exhibit values that had varied of 0,47 the 1,00 (average similarity of 0,74). Therefore, this study intraspecific Active Bank of Germoplasma-Passifloras gift of the UESC evidenced the true genetic variability and will lead the adoption of new strategies of sampling to increase the representability of the species.

Kew-words:, Ornamentation,, microsatellites markers, genetic diversity, plant genetic resources. .

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é o mais bem representado dentro da família Passifloraceae, e tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrados desde regiões de clima tropical até temperado quente (CERVI, 2006a). Apesar da grande representabilidade do gênero *Passiflora*, dentro da família, cerca de 520 espécies (CERVI, 2005), várias espécies ainda vêm sendo descobertas e caracterizadas (VITTA; BERNACCI, 2004; CERVI, 2006b; NUNES; QUEIRÓZ, 2007). As espécies de *Passiflora* estão distribuídas na flora das regiões tropicais dos Estados Unidos até Américas do Sul, inclusive o Brasil, e apresentam-se na natureza na forma de plantas herbáceas ou lenhosas, e às vezes como trepadeiras. No caule exibem gavinhas, as folhas são variáveis quanto ao tamanho e formas (JØRGENSEN et al., 1984; TEIXEIRA, 1994), as flores são hermafroditas, exibindo variações de cores e tamanho; os frutos são arredondados ou alongados (CERVI, 2007). Apesar de apresentar flores hermafroditas, a maioria das espécies de *Passifloras* é autoincompatível (AKAMINE; GIROLAMI, 1957; BRUCKNER et al., 2005), necessitando de outros genótipos para que a produção de frutos ocorra. Citogeneticamente existem variações no número de cromossomos entre as diferentes espécies variando de $2n = 12$ a $2n = 72$ (MELLETTI et al., 2003; SOUZA, et al., 2008). A importância econômica que é conferida ao maracujazeiro advém,

principalmente, do seu fruto. As espécies de *P. alata* (maracujazeiro doce) e *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujazeiro azedo) representam as espécies mais comercializadas do gênero, especialmente, na forma de sucos, sorvetes, licores e consumo *in natura* da fruta (LIMA, 1994). Outros valores são atribuídos às espécies do gênero *Passiflora*, como medicinal, onde se destaca *P. incarnata*, devido ao seu efeito sedativo sobre o sistema nervoso (DHAWAN, 2001; MATTOS, 2002; DHAWAN et al., 2004), e ornamental, onde se destacam *P. caerulea*, *P. incarnata*, dentre outras, que são cultivadas em países europeus e nos EUA (RUSHING, 2003; PEIXOTO, 2005) para este fim. Essas espécies encantam pela forma, tamanho, cores e beleza, tanto das flores quanto das folhas (FISCHER, 2004; PEIXOTO, 2005; JUNQUEIRA, 2007; ABREU et al., 2009). A cultura do maracujazeiro para fins ornamentais é bem praticada em países do hemisfério norte, onde há obtenção de híbridos com as características atraentes para o tamanho e a cor de flores, além de folhas exuberantes (KING, 2001; FISCHER, 2004). Apesar das passifloras serem pouco reconhecidas como planta ornamental no Brasil (ABREU et al., 2009), vários estudos vêm sendo conduzidos com esse propósito (JUNQUEIRA, 2007; ABREU, 2008; SANTOS, 2008; VIANA, 2009).

O processo de extinção de espécies silvestres ocorre, principalmente, devido à destruição dos seus habitats e comunidades naturais, pela ocupação desordenada de grandes áreas e por práticas agrícolas (GOEDERT, 2007), o que tem comprometido a potencialidade de várias espécies relevantes. Portanto, estratégias vêm sendo adotadas para evitar erosões da biodiversidade genética, tais como a formação de recursos genéticos, visando à sua utilização para a pesquisa em melhoramento genético por meio do 'germoplasma'. Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) conservam a biodiversidade, ou pelo menos parte dela, utilizando principalmente a estratégia da conservação *ex situ*, que conserva os componentes da biodiversidade biológica fora de seus habitats naturais.

A conservação *ex situ* pode ser realizada por meio da conservação de plantas, sementes, tecidos *in vitro*, criopreservação (SANTOS, 2001) e por meio de bancos de DNA (SANTOS; SALOMÃO, 2007). A falta de informações sobre os materiais dos bancos de germoplasma é uma das causas do uso incipiente da variabilidade disponível (VALLS, 2007). A caracterização de BAGs tem sido realizada abrangendo estudos baseados em caracterização morfo-agronômica

(SOUZA, et al., 2008; TAZIMA et al., 2009), citogenética (PEÑALOZA; POZZOBON, 2007), botânica (GUEN et al., 2002; ARAÚJO et al., 2008) e molecular (ALVES, 2002; CROCHEMORE et al., 2003; GANGA et al., 2004; ZACARIAS et al., 2004). Dentre todas essas áreas, a molecular tem recebido um enfoque maior, devido, principalmente, a obtenção de marcadores moleculares baseados em fragmentos de DNA, que podem ser amplificados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e por meio de enzimas de restrição e hibridizações, que permitem verificar variações de seqüência na molécula de DNA (FERREIRA et al., 2007).

Entre os marcadores que são mais empregados, destacam-se RAPD, AFLP, SSR e RFLP, que têm se mostrado eficientes na resolução de várias questões biológicas, na identificação de amostras duplicadas na coleção; oferecendo ao curador opções de descarte ou concatenação de amostras, priorização para novas expedições e a identificação de acessos de maior interesse para o programa de melhoramento adequado (FERREIRA et al., 2007). Dentre os marcadores moleculares apresentados, os do tipo microssatélites, ou SSR, são os que apresentam maior reproducibilidade. Além disso, características como rapidez da técnica, baixa quantidade de DNA requerida, codominância e alto polimorfismo (BRONDANI et al., 1998; RALLO et al., 2000) tornam os marcadores moleculares viáveis (TRIVED, 2006; ANGELICI et al., 2008) Os microssatélites (SSR) são seqüências curtas de DNA, dois a seis pares de bases, repetidas em *tandem* (FIELD; WILLS, 1996; TÓTH et al., 2006), que estão distribuídos por todo o genoma de eucariotos e procariotos (SUTHERLAND; RICHARDS, 1995; MORGANTE et al., 2002), e vem sendo bastante utilizados na caracterização de germoplasma (AKPINAR et al., 2010). A conservação de seqüências que flanqueiam os microssatélites pode ocorrer entre espécies, gêneros e até entre famílias diferentes (BALLOUX et al., 1998; GARDNER, 2002), onde se observa que, quanto maior a distância genética (filogenética), menor a taxa de amplificação quando utilizados *primers* heterólogos (PRIMMER et al., 1996; BALLOUX et al., 1998; BARBARÁ et al., 2007). Uma das vantagens de se aplicar a amplificação heteróloga de *primers* SSR é o estudo de diversidade genética em populações de espécies silvestres.

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de caracterizar a diversidade genética presente em espécies silvestres do Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Passifloras) da UESC, empregando marcadores microssatélites

e, com esses resultados, acessar a variabilidade genética entre os acessos de cada espécie, para que possam ser corretamente preservadas e utilizadas em programas de melhoramento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora*, dentro da família Passifloraceae, é o mais representativo, com suas espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América, Ásia e África (ULMER; MACDOUGAL, 2004; VANDERPLANK, 2006). A distribuição e variabilidade de espécies de *Passifloras* nativas da floresta Atlântica e região Amazônica no Brasil se destacam, por serem biomas considerados o centro de origem de um grande número de espécies autóctones (GAMMA, 2004).

Para a família Passifloraceae, diferentes números de espécies foram relatados: 600 (BARROSO, 1978), 530 (WATSON; DALWTI, 1992), 630 (VANDERPLANK, 2000). Mais recentemente, 750 espécies foram descritas na família (FEUILLET; MACDOUGAL, 2007). Para o gênero *Passiflora*, foram constatadas cerca de 520 espécies (CERVI, 2005).

Na Bahia, Brasil, o gênero é representado por mais de 30 espécies, com distribuição ampla, ocorrendo em praticamente todos os biomas do Estado (NUNES;

QUEIROZ, 2006). No Brasil, os gêneros *Passiflora* e *Dikea* são os únicos existentes (CUNHA et al., 2002; LOPES, 1994).

Novas espécies encontradas no Brasil vem sendo descritas. *Passiflora cervii*, *P. jiboiaensis* e *P. transversalis* foram inseridas no subgênero *Decaloba* (AZEVEDO, 2008); *P. contracta*, encontrada no Espírito Santo, Bahia e Pernambuco, foi inserida na secção *Tetrastylis*-(VITTA; BERNACCI, 2004); *P. boticariorana* é encontrada em Minas Gerais (CERVI, 2006). *P. mucugeana* foi encontrada na região da Chapada da Diamantina, estado da Bahia, (NUNES; QUEIRÓZ, 2007). Novas espécies ainda vêm sendo relatadas (CERVI, 2006), inclusive no sul da Bahia, como *P. cacaoensis* (VIANA, 2009).

As passifloras apresentam-se na forma de trepadeiras herbáceas ou lenhosas e são vigorosas. O caule pode ser cilíndrico, angular, sub-angular, raramente quadrangular e estriado longitudinalmente (CERVI, 1997). As folhas podem ser arredondadas ou partidas e nota-se uma variação muito grande no tamanho (JØRGENSEN et al., 1984; TEIXEIRA, 1994) e forma, inclusive dentro de uma mesma espécie e, as vezes, em um mesmo exemplar, como em *P. setacea* (CERVI, 1997), cujas folhas são alternas, geralmente simples e de forma variável.

A maioria das espécies apresenta glândulas nectaríferas no pecíolo, na margem da bráctea ou na parte dorsal da folha (CUNHA et al., 2004). A posição, tamanho e forma das brácteas são características importantes para a separação taxonômica de gêneros (VANDERPLANK, 1996). Apresentam gavinhas (modificações foliares que servem para prender a planta a suportes) em quase todas as espécies (VANDERPLANK, 1996), normalmente são solitárias e axilares, bem desenvolvidas, robustas e tênues (CERVI, 1997).

As flores do gênero *Passiflora* são hermafroditas, geralmente isoladas ou aos pares nas axilas das folhas, e se apresentam de forma variada (CUNHA et al., 2004). Exibem uma ampla gama de coloração, podendo ser encontradas em tons de branco, laranja, vermelho, roxo, amarelo e azul. Todas as espécies de *Passiflora* possuem cálice e corola, as sépalas e pétalas são sempre em número de cinco (CERVI, 1997) e as pétalas são ligeiramente menores do que as sépalas (KILLIP, 1938). Os frutos são arredondados ou alongados de coloração variada, sede o esverdeado ao roxo-. As sementes sempre são numerosas, comprimidas e possuem uma testa dura. A testa pode ser reticulada, estriada ou sulcada (CERVI, 1997).

Quanto à polinização, a maioria das espécies de *Passifloras* é auto-incompatível (AKAMINE; GIROLAMI, 1957) e dependem, portanto, da polinização cruzada para produzir frutos. A polinização pelo vento é mal sucedida, devido ao grande peso e viscosidade de seus grãos de pólen, necessitando, portanto, de um agente polinizador (LIMA, 1999). Os agentes polinizadores que têm se mostrado mais eficientes são as mamangavas, abelhas do gênero *Xylocopa* (LIMA, 1999), e o beija-flor *Ensifera ensifera* (LINDENBERG, 2001). E para as espécies cujas flores abrem à noite, a polinização é realizada também por morcegos (VARASSIN et al., 2001).

No que se refere à propagação das espécies de *Passiflora*, a utilização de sementes e estacas são as formas mais comuns de propagação (VANDERPLANK, 2006). As sementes de algumas espécies são viáveis para plantio por 12 meses, entretanto precisam ser mantidas em condições controladas de temperatura e luz (VANDERPLANK, 2006). Relatos da literatura sobre as sementes de passifloráceas se referem ao período lento e irregular de germinação (FERREIRA et al., 2001).

Abordagens citogenéticas têm se referido ao número de cromossomos de algumas espécies. Existem variações quanto ao número de cromossomos $2n = 12, 18, 20, 24, 36, 72$ (MELO et al., 2001; MELETTI et al., 2003; SOUZA et al., 2003a). O número cromossômico de várias espécies de *Passiflora* foi relatado e, dentre as estudadas, a maioria apresentou o número cromossômico $2x = 2n = 18$ (SOUZA et al., 2008). Na análise do cariótipo de seis espécies ($2n = 18$) (SOUZA et al., 2003a) e 12 espécies ($2n=18$) (SOUZA et al., 2003b) de *Passiflora*, foram observadas variações interespecíficas no tamanho do genoma entre espécies relacionadas, indicando que tais variações podem ter um valor adaptativo em resposta às mudanças ambientais. A utilização de dados citogenéticos na sistemática vegetal é admitida como um dos mais importantes instrumentos para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos de evolução (GUERRA, 1986).

A família Passifloraceae apresenta ampla variabilidade morfológica (CROCHEMORE et al., 2003a; PRIMOT et al., 2005) e genética (FAJARDO et al., 1998; SÁNCHEZ et al., 1999; AUKAR et al., 2002; SEGURA et al., 2002; CROCHEMORE et al., 2003b; VIANA, et al., 2003; HANSEN et al., 2006; BELLON 2007) a ser melhor caracterizada, conservada e convenientemente utilizada (SOUZA e MELETTI, 1997).

2.2. A importância econômica do gênero

Embora o gênero apresente uma gama de espécies, estudos que mostram sua importância sob aspectos econômicos, seja por seus frutos comestíveis, pelo aspecto ornamental ou pelas suas características medicinais, ainda são incipientes para muitas espécies do gênero (BERNACCI, 2003). Algumas espécies possuem frutos comestíveis, dessas apenas cinco a seis apresentam importância econômica; cerca de 10-15 são cultivadas ocasionalmente e a maioria é cultivada apenas localmente em pequena escala ou são explorados como recurso natural (ULMER; MACDOUGAL, 2004). As espécies mais importantes com frutos comestíveis são *P. edulis* (incluindo as formas *P. edulis* f. *edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*), *P. laurifolia*, *P. maliformis*, *P. actinia*, *P. alata*, *P. ambigua*, *P. nitida*, *P. incarnata*, *P. serrato-digitada*, *P. cearulea*, *P. coccinea* (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Cabe ressaltar que apesar de apresentarem características comestíveis, alguns frutos não são apreciados.

Dentre as espécies que detêm valores para serem cultivadas comercialmente no Brasil, destinadas a produção de frutos são: *P. alata* Curtis (maracujá-doce) (BERNACCI, 2003) e *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo). O cultivo em escala doméstica, com comercialização restrita a região de cultivo das espécies foi relatado para *P. nitida*, *P. cincinnata* e *P. quadrangularis* (INGLEZ de SOUSA; MELETTI, 1997). Embora todas as espécies produzam frutos, nem todos podem ser consumidos, alguns apresentando características de toxicidade (FALEIRO et al., 2005). Apesar disso, é enfatizado o uso das espécies do gênero, principalmente na alimentação humana, na forma de sucos, doces, sorvetes, licores e consumo *in natura* da fruta (LIMA, 1999).

O maracujazeiro vem sendo utilizado como planta medicinal devido à sua ação benéfica sobre o sistema nervoso, sendo indicado, principalmente, no combate à ansiedade, à depressão e à insônia (MATTOS, 2002; DHAWAN et al., 2004). Dentre as espécies silvestres utilizadas, *P. incarnata* tem uma longa história por seu efeito sedativo. Camundongos foram submetidos a extratos de vários constituintes químicos das espécies *P. incarnata* e *P. edulis*; foi observado o maior efeito biológico de *P. incarnata* sob os animais, sendo considerada de maior interesse

medicinal (DHAWAN et al., 2001). Contudo, a grande maioria das espécies de *Passiflora* ainda não foi estudada quanto às suas propriedades medicinais e funcionais. Mesmo para as espécies mais conhecidas, ainda faltam estudos que comprovem os seus efeitos em humanos (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005).

No tocante a ornamentação, o seu valor é conferido pelas belas flores que as diferentes espécies produzem, exercendo atração pelo seu tamanho, pela exuberância de suas cores e pela originalidade de suas formas (PEIXOTO, 2005). Algumas outras características como o número abundante de flores, florescimento mais de uma vez por ano e folhagem exuberante as inserem na lista de plantas potencialmente ornamentais (SOUZA; PEREIRA, 2003). Entretanto, apesar do seu enorme potencial ornamental, existindo dezenas de espécies silvestres com características para esse fim, o gênero *Passiflora* é praticamente ignorado pelos paisagistas e também pelo público em geral no Brasil (ABREU, 2009).

Muitas espécies de *Passiflora* podem ser hibridizadas sem dificuldades, e para algumas espécies, é mais viável polinizar uma planta com o pólen de outra do que com o pólen da mesma planta devido à auto-incompatibilidade encontrada no gênero (FISCHER, 2004). Atualmente, um dos maiores pólos de produção de híbridos de *Passiflora* fica na Alemanha, onde as espécies são melhoradas geneticamente pela indução à tetraploidia. À exemplo, *P.* 'Jara', *P.* 'Clear Sky' e *P.* 'Emil Kugler', as quais compartilham de um mesmo genitor, a *P. cearulea*, e apresentam flores maiores e mais vistosas em plantas adaptadas ao cultivo em vasos (FISCHER, 2004). Para a produção desses híbridos tetraplóides ($4n = 36$), sementes são tratadas com colchicina, uma substância mutagênica antimitótica (KING, 2001).

O potencial do maracujazeiro como elemento de decoração e a sua utilização em países do hemisfério norte são relatados há mais de um século, (PEIXOTO, 2005). Apesar de no Brasil ainda não se ter nenhum registro formal do uso de *Passifloras* em ornamentações, pesquisas vêm sendo conduzidas para esse propósito (ABREU, 2008; SANTOS, 2008). Em 2007 foram lançadas as variedades denominadas BRS 'Estrela do Cerrado', BRS 'Rubiflora' e BRS 'Roseflora', originadas a partir de cruzamentos e retrocruzamentos entre *P. coccinea* e *P. setacea* (JUNQUEIRA et al., 2007). Esses híbridos apresentam alta produtividade de flores, além de serem tolerantes às doenças e facilmente propagados; portanto,

detêm características para serem utilizados como porta-enxerto para o maracujazeiro comercial (FALEIRO, 2005; JUNQUEIRA, 2007).

Abordagens foram realizadas sobre as perspectivas do uso de *Passiflora* no mercado ornamental no Brasil, expondo vários híbridos provenientes de espécies silvestres e as principais dificuldades que o mercado nacional enfrenta para expandir a cultura do cultivo de *Passifloras*, no que tange a ornamentação (PEIXOTO, 2005; ABREU et al., 2009). A “Passiflora Society Internacional” (www.passiflora.org) tem dados atuais de registros de híbridos de *Passiflora*, o qual consta com mais de 600 híbridos registrados desde 2004 (KING, 2009).

2.3. Bancos de Germoplasma

O Brasil é, reconhecidamente, um dos países com maior biodiversidade do planeta. Populações naturais, geralmente, têm níveis altos de variação genética (NEVO, 2006), que é introduzida por mutação ou migração (fluxo gênico) de indivíduos de outras populações (MATIOLI, 2001). Muitas espécies vegetais possuem meios efetivos de dispersão de genes (HAMRICK et al., 1979; LOVELESS; HAMRICK, 1984) que ocorre por meio de pólen e/ou sementes transportadas pela fauna e outros meios, de uma população para outra, podendo aumentar a variabilidade de alelos de uma população (FREITAS; BERED, 2003).

A conservação da biodiversidade representa um dos maiores desafios, em função do elevado nível de perturbações antrópicas dos ecossistemas naturais, as quais podem ser muitas vezes irreversíveis (VIANA, 1995). Dentre essas alterações, aquelas que reduzem os habitats e a conseqüente extinção de várias espécies, conhecido como erosão genética, comprometem o patrimônio genético desses ecossistemas (COLLEVATTI et al., 2001; PINTO et al., 2004). O fenômeno da erosão genética, apesar de irreversível, exige certas ações que devem ser tomadas para evitar ou minimizar as suas conseqüências. A formação de bancos de germoplasma para a conservação da variabilidade genética surge como uma alternativa viável (FALEIRO et al., 2005).

Entre as muitas razões que a humanidade tem para valorizar e conservar a diversidade biológica se destacam as seguintes afirmações: todo alimento provém de espécies silvestres domesticadas; além disso, a maioria dos medicamentos é

originado de espécies e plantas medicinais, ainda encontrados em estados silvestres, incluindo os principais sedativos, agentes para controle de natalidade dentre vários outros (GOEDERT, 2007). A preocupação é a preservação da variabilidade com o objetivo de manter uma larga faixa de espécies, variedades e genes (GOEDERT et al., 1997), e várias instituições de pesquisa têm se voltado para este propósito por meio da implementação de Bancos de Germoplasma. A “Bioversity International” denomina germoplasma como todo material que constitui a base física da herança de uma espécie e que se transmite de uma geração para outra por meio de células reprodutivas (IBPGR, 1991). E de uma forma mais prática, germoplasma pode ser definido como a unidade conservadora de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro (VALOIS et al., 1996).

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são coleções de acessos que são utilizados, rotineiramente, para propósitos de pesquisa, recorrendo-se aos materiais neles depositados (VALOIS et al., 1996). A coleção ativa é multiplicada de acordo com a demanda pelo germoplasma por parte do pesquisador, onde o caráter dinâmico da coleção ativa é indicado pelo fato de que acessos entram e saem de seu inventário, conforme decisões gerenciais. Geralmente funciona em dois ciclos: plantas vivas crescendo no campo e sementes armazenadas para regeneração ou multiplicação de materiais (VALOIS et al., 1996). Também pode ser representada por anteras, tecidos ou estruturas mais simples, a fim de se preservar a diversidade genética da espécie, sendo conservada na forma *in situ* ou *ex situ* (SANTOS, 2001). A introdução de germoplasma no Brasil é um processo dinâmico, geralmente utilizado para se obter variedades mais produtivas, resistentes a pragas e adaptadas às nossas condições climáticas (WETZEL; FERREIRA, 2007).

É razoável admitir que qualquer coleção de germoplasma, por maior que seja, é apenas uma pequena amostra da variabilidade total da espécie (ALLARD, 1970). A amostragem genética provoca a alteração aleatória da constituição genotípica e alélica de populações, acessos, amostras de plantas ou sementes. Quando o número é finito resulta na perda de alelos e genótipos por amostragem (WETZEL; FERREIRA, 2007).

A conservação *ex situ* é uma das estratégias preconizadas para manter, em longo prazo e com máxima integridade genética e biológica, genótipos de espécies cultivadas e silvestres de raças locais e de espécies não domesticadas, fora do seu

ambiente natural (FAO, 1996). Nas coleções de germoplasma *ex situ*, cada elemento é chamado de acesso, termo empregado para qualificar toda amostra que representa a variação genética de uma população ou indivíduo obtido por coleta ou por intercâmbio (VILELA-MORALES et al.,1997). Este tipo de conservação inclui conservação de coleções de sementes, de material vegetativo *in vitro*, de DNA, de pólen, coleções a campo, amostras em casa de vegetação e jardins botânicos (SANTOS; SALOMÃO, 2007). São usualmente conservadas em coleções espécies perenes, como as fruteiras, madeireiras, oleíferas, laticíferas. Espécies que apresentam sementes ortodoxas são conservadas em bancos de sementes convencionais, espécies de propagação vegetativa são conservadas em coleções a campo ou *in vitro* (SANTOS; SALOMÃO, 2007). Contudo, esses métodos não são excludentes, mas complementares.

Outra forma de preservação de espécies de grande importância econômica é a criopreservação. Essa técnica consiste da conservação do material biológico em nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor a -150°C (SANTOS, 2001). É uma alternativa para espécies que possuem sementes recalcitrantes (sensíveis a desidratação) e para aquelas espécies cuja propagação se dá vegetativamente (batata-doce, batata-inglesa, mandioca) ou que não produzem sementes viáveis (banana) para as quais não existe uma metodologia de conservação a longo prazo (SANTOS, 2001; SANTOS; SALOMÃO, 2007). Essas espécies são conservadas geralmente em casa de vegetação ou no campo.

Os métodos de conservação *ex situ*, apesar de serem de extrema importância, possuem desvantagens, por exemplo, a campo o material está submetido às intempéries ambientais (STUSHNOFF, 1991). Os bancos de sementes convencionais (temperatura -18°C) não promovem a supressão total da taxa respiratória e do processo de deteriorização (STANWOOD, 1984). A técnica de conservação *in vitro* permite sua conservação somente por curtos períodos do tempo (9 a 12 meses) e requer que o material seja cultivado periodicamente em casa de vegetação ou no campo (BAJAJ, 1995).

Conservação *in situ* significa a conservação dos ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus ambientes naturais, também denominada conservação genética de espécies em reserva. E no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, a conservação se dá

nos ambientes onde elas desenvolveram suas propriedades distintas, ou conservação *on farm* (SCARIOT; SEVILHA, 2007). Mesmo para muitas espécies que possam ser adequadamente conservadas *ex situ*, a conservação *in situ*, por permitir a continuidade dos processos evolutivos, também pode ser necessária para a efetiva manutenção da variabilidade em longo prazo (SCARIOT; SEVILHA, 2007; SCHOEN; BROWN, 2001). Outra vantagem é a conservação de outras espécies de plantas e animais associados, bem como a conservação de espécies com sementes recalcitrantes (SCARIOT; SEVILHA, 2007). Dentre essas, a conservação *in situ* é a mais adequada, por manter a espécie no seu ambiente natural. Por outro lado, quando a conservação *in situ* é impraticável a conservação *ex situ* deve ser implementada (DIAS; KAGEYAMA, 1991). Vale ressaltar que, em geral, estas duas modalidades são complementares e não excludentes.

No Brasil várias culturas tem sido alvo de conservação para fins, principalmente, de melhoramento genético. Dentre os grãos, pode-se destacar o milho conservado em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) na Embrapa Milho e Sorgo, a soja, representada na Embrapa Soja, Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), e o feijão, concentrado principalmente na Embrapa Meio-Norte e Embrapa Arroz e Feijão (QUEIROZ; LOPES, 2007). As olerícolas estão representadas por várias espécies, porém se destacam algumas como *Allium cepa*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Daucus carota* L., *Anacardium occidentale* e *Citrullus lanatus*. Os bancos de germoplasma de olerícolas são menos expressivos quando comparados com os de grãos (QUEIROZ; LOPES, 2007). Culturas como *Mangifera indica*, *Anacardium occidentale*, *Musa paradisiaca* também são representadas em bancos de germoplasma de fruteiras, bem como a *Prunus domestica* e *Prunus pérsica*.

No tocante conservação de *Passifloras* por meio de BAGs, segundo dados obtidos até 2005, há aproximadamente 67 espécies mantidas em diferentes BAGs no Brasil, são eles: CNPMF, UNESP, IAPAR, IAC, CPAC, ESALQ, UENF, UFRRJ (FERREIRA, 2005) e UESC (PEREIRA; SOUZA, 2005). A UESC desde 2004 possui um BAG-Passifloras (PEREIRA; SOUZA, 2005; VIANA et al., 2005). Na UESC, o Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Passifloras) com mais de 40 espécies, vem sendo utilizado para seleção de genitores na produção de híbridos interespecíficos com potencial para ornamentação de interiores (www.passifloras.org). Híbridos

interespecíficos já foram obtidos para esse fim, como *P.* 'Alva', *P.* 'Priscilla' e *P.* 'Aninha' (ABREU, 2008; SANTOS, 2008). Porém, torna-se prioritária a realização de estudos de caracterização morfológica, molecular e reprodutiva em progênes híbridas já obtidas, para que as pesquisas possam avançar, visando à diversificação de cultivo na região sul da Bahia e para a conservação da biodiversidade e exploração sustentável dos recursos biológicos existentes.

Nos programas de recursos genéticos e melhoramento, os BAGs desempenham um papel de extrema importância. Os genótipos selecionados podem ser usados de forma direta, ou empregados nos programas de melhoramento, visando à criação de novas cultivares (ALVES, 2002).

2.3.1. Caracterização Molecular de Germoplasma

A caracterização é uma atividade essencial no manejo de coleções de germoplasma (VICENTE et al., 2005) e refere-se à observação, mensuração e documentação de características da planta que são herdáveis, consistentes e homogêneas expressas em vários ambientes (FERREIRA et al., 2007). A avaliação e caracterização do germoplasma, quando bem conduzidas, apresentam vantagens, como permitir a identificação de acessos duplicados, oferecendo ao curador opções de concatenação de amostras ou descarte de acessos (FERREIRA et al., 2007), estabelecimento de coleções nucleares, e identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos, bem como da ocorrência ou não de variabilidade intrínseca em acessos individuais (VALLS, 2007).

Em plantas perenes, como o maracujazeiro, essa atividade desempenha papel importante por reduzir gastos consideráveis na manutenção, quantificação da diversidade, aperfeiçoar estratégias de amostragem, além de identificar acessos desejáveis para programas de melhoramento genético (OLIVEIRA, 2005). A maioria das informações disponíveis para o melhorista, no que tange a possível diversidade genética entre acessos em alguns BAGs, é a sua origem geográfica, principalmente no caso de material silvestre (FERREIRA et al., 2007).

Nas coleções de germoplasma, a caracterização tem sido feita geralmente por dados morfológicos (SOUZA, et al., 2008; TAZIMA et al., 2009), botânicos e agrônômicos (GUEN et al., 2002; ARAÚJO et al., 2008). Mas essa metodologia tem baixa precisão, devido à interação entre genótipo x ambiente (BARROS, 1991),

principalmente em espécies perenes. Essa caracterização tem sido complementada por outros critérios, visto que descritores morfológicos apresentam algumas limitações como pouco polimorfismo e algumas características morfológicas são sujeitas a variação ambiental e a caracterização morfológica é intensiva em tempo e recursos para a sua execução (FERREIRA et al., 2007).

A atividade de caracterização de germoplasma vem sendo complementada pela aplicação de marcadores moleculares (OLIVEIRA; KAESEL, 2008; SANTOS et al., 2008; CHAO et al., 2009; SUN et al., 2009) que fornecem um estudo direto do genótipo por detectar diferenças a nível de DNA. A combinação da caracterização por marcadores moleculares e por descritores morfológicos parece ser mais recomendada para estudo de diversidade em bancos de germoplasma (DIAS, 1994). Entretanto, em alguns casos, pode haver divergências, sugerindo que os padrões evolutivos morfológicos e moleculares são distintos.

Vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para analisar a diversidade genética e cada método fornece diferentes tipos de informação, portanto, a escolha de método mais apropriado depende da pergunta biológica que se pretende responder (FERREIRA et al., 2007). Classes de marcadores moleculares, baseados em PCR, tem sido reportados para diversos estudos, incluindo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), STSs (*Sequence-Tagged Sites*) (OLSON et al., 1989), e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995), SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites (TAUTZ, 1989; WEBBER; MAY, 1989).

O tipo de estudo biológico que o pesquisador pretende desenvolver tem impacto direto na escolha do marcador molecular apropriado (FERREIRA et al., 2007). Se análise de diversidade é voltada para a compreensão das relações genéticas no âmbito interespecífico, então, regiões mais conservadas do genoma devem ser amostradas. Se, no entanto, a análise da diversidade é realizada entre indivíduos de uma mesma espécie, então, geralmente, regiões mais variáveis do genoma são estudadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A diversidade genética tem sido referida como a riqueza de espécies dentro de um ecossistema e também como nível de variabilidade gênica existente dentro de cada população (NEI, 1973). O acesso à diversidade por marcadores moleculares dos BAGs vem sendo praticada em algumas culturas tais como cupuaçuzeiro

(OLIVEIRA; KAESEL, 2008), feijão comum (ANGIOI et al., 2009), mandioca (CURY, 1993; PEREIRA, 1989), guaranazeiro (NASCIMENTO FILHO et al., 2001), espécies do gênero *Citrus* (NOELLE et al., 2006; KOEHLER-SANTOS et al., 2003), cevada (JOANNE et al., 2000), trigo (HUANG , 2000; TEKLU et al.,2007), batata (MCGREGOR et al., 2000) e maçã (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001), utilizando diversos marcadores (RAPD, ISSR, AFLP e SSR) baseados em seqüências de DNA.

Para espécies do gênero *Passiflora*, estudos sobre a caracterização da diversidade genética com a utilização de marcadores moleculares nos germoplasmas mantidos nos BAGs são recentes. Entretanto, a variabilidade genética foi estudada em populações de *Passiflora* do BAG da UENF-RJ e IAPAR's, respectivamente, utilizando marcadores do tipo RAPD, com a finalidade de se analisar a diversidade genética, tanto intra quanto interespecífica (VIANA et al., 2006; CROCHEMORE et al.,2003b). Marcadores do tipo AFLP foram usados para estimar a diversidade genética entre acessos de maracujá-amarelo (GANGA et al., 2004) e a diversidade genética em populações de *P. alata* (LOSS et al., 2006). A caracterização por meio de marcadores moleculares tem fornecido um perfil seguro, direto e eficiente para avaliar a variação genética no germoplasma.

A ausência de caracterização em coleções de germoplasma levam à três situações indesejáveis: i) estreitamento da base genética dos programas de melhoramento, pelo uso contínuo de um pequeno conjunto de linhagens aparentadas (TANKSLEY; McCOUCH, 1997); ii) carência de informações agrônômica e genética sobre os acessos conservados, o que inibe o seu uso pelos os programas de melhoramento (FRANKEL, 1974); iii) falta de informação sobre os materiais dos bancos de germoplasma (VALLS, 2007).

2.4. Marcadores microssatélites

2.4.1. Aspectos Gerais

As técnicas de marcadores moleculares foram desenvolvidas como resultado da necessidade direta de se analisar o genoma, já que até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenotípicos de fácil identificação visual (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Com a descoberta da técnica de PCR

(Polymerase Chain Reaction) (MULLIS; FALOONA, 1987), utilizando uma DNA polimerase termoestável e termocicladores programáveis com elevada capacidade de processamento, houve uma grande automatização na síntese enzimática *in vitro* de DNA.

Dentre os marcadores moleculares que usam desta técnica, os do tipo microssatélites, também chamados SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou STR (*Sequence Tandem Repeat*), são os mais utilizados atualmente. Eles consistem de seqüências de um a cinco ou seis nucleotídeos (FIELD; WILLS, 1996; TÓTH et al., 2006) (SUTHERLAND; RICHARDS, 1995) repetidos em *tandem*, dispersos em genomas de eucariotos e procariotos (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Encontram-se no genoma na forma de mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos (OLIVEIRA et al., 2006) onde, nos primatas são mais abundantes os que apresentam apenas um nucleotídeo repetido, mononucleotídeo, enquanto nos táxons de roedores, mamíferos, artrópodes, fungos e plantas predominam os dinucleotídeos, (TÓTH et al., 2006).

A provável origem dos microssatélites deve-se à duplicação de base adjacente como o principal mecanismo de origem das repetições, representando cerca de 70% dos 40 genes analisados no *Human Gene Mutation Database* (ZHU et al., 2000). Em adição, as altas taxas de mutações dos microssatélites, 10^{-2} a 10^{-6} (LI et al., 2002), tem sido sugerida por vários mecanismos, incluindo erros durante recombinação, crossing-over desigual e deslizamento da DNA polimerase durante a replicação, sendo o último, o processo mutacional mais provável no aumento das repetições dos microssatélites (BICHARA et al., 2000; ANMARKRUD et al., 2008).

Evidências de mutações nas seqüências microssatélites foram vistas nas ampliações *in vitro* (PCR), onde essas seqüências, principalmente os que abrigam repetições de dinucleotídeos, têm se mostrado vulnerável à formação das chamadas bandas *stutter*, também chamadas bandas sombras ou produtos do deslizamento da DNA polimerase, e diferem do tamanho do alelo principal por um número a mais ou a menos de repetições (PINTO et al., 2001; SHINDE et al., 2003). Esse padrão de multibandas dificulta a interpretação dos locos microssatélites (WALSH et al., 1996).

No que tange à expansão ou evolução natural dos microssatélites, alguns estudos expõem a tendência ao aumento de suas repetições (HELLEGREN et al., 1995; COOPER et al., 1998; BICHARA et al., 2000; ANMARKRUD et al., 2008) e a

fixação desses novos microssatélites gerados é determinada por vários fatores, dentre eles, o tipo de repetição e posição genômica (TÓTH et al., 2006). Considerando todos esses processos evolutivos, os quais os microssatélites estão envolvidos, eles podem ser definidos como 'sequências simples com evolução complexa' (HELLEGREN, 2004).

Em um experimento laborioso, foi revelado que os microssatélites são frequentes e estão amplamente distribuídos no genoma de plantas (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Estudos demonstram que essas repetições estão, na sua maioria, distribuídas aleatoriamente, sendo a maior parte em regiões não codificantes (TÓTH et al., 2006). Entretanto, evidências têm provado que a distribuição de SSR não é ao acaso (MORGANTE et al., 2002; LI et al., 2002; VARSHNEY et al., 2005), provavelmente devido a seus efeitos sobre a organização da cromatina, regulação da atividade gênica, recombinação, replicação do DNA, ciclo celular e sistema de reparo (LI et al., 2002).

O entendimento dos processos mutacionais nos quais as seqüências microssatélites estão envolvidas, bem como a sua ocorrência ubíqua e hipervariabilidade (HELLEGREN, 2004; MORGANTE; OLIVIERI, 1993; GARNER, 2002), sua expressão co-dominante e o multialelismo, e, ainda, por serem considerados os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, conhecido como PIC (Polymorphism Information Content), dentro dos marcadores moleculares disponíveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995), explicam a grande utilidade desses marcadores moleculares. A observação de que ocorre conservação de sítios que flanqueiam as regiões microssatélites entre espécies relacionadas torna possível, em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies, gêneros até mesmo família, usando-se de *primers* heterólogos (BARBARÁ et al., 2007).

Os marcadores microssatélites foram primeiro desenvolvidos em humanos (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989) e logo receberam a atenção dos melhoristas e geneticistas de plantas. Esses marcadores estão substituindo os demais em vários tipos de estudos genéticos, devido a sua reproducibilidade, simplicidade e rapidez da técnica, baixa quantidade de DNA requerida e grande poder de resolução (BRONDANI et al., 1998; RALLO et al., 2000). Tendo em vista todas essas características genéticas, nos últimos anos os marcadores

microsatélites têm se revelado úteis em várias áreas da ciência. À exemplo, construção de mapas genéticos (OLIVEIRA, 2006; CARNEIRO et al., 2002; WANG et al., 2009), identificação de genótipos (*fingerprinting*), estudos de genética de populações naturais (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002) de plantas (KAJEYAMA et al., 2003; FERREIRA-RAMOS et al., 2007), animais (BEEBEE, 2009; CARRANZA et al., 2009) e caracterização de germoplasma (ADNEW et al., 2005; GARCIA et al., 2007).

Estudos com abordagem molecular de passifloras utilizando os marcadores microsatélites podem ser considerados incipientes, devido à escassez desses marcadores para espécies do gênero, podendo ser atribuído ao custo requerido para o desenvolvimento dos mesmos. Entretanto, 14 *primers* microsatélites foram desenvolvidos para *P. alata*, cinco para *P. pohllii* (PÁDUA et al., 2005), e 107 para *P. edulis* f. *flavicarpa* (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA, 2006). O desenvolvimento destes marcadores para *Passiflora* abre a possibilidade para realização de estudos referentes à estrutura genética populacional de forma mais eficiente, além de auxiliar no estabelecimento de estratégias de conservação de germoplasma (PÁDUA, 2006).

Com o desenvolvimento de *primers* microsatélites para *P. edulis* f. *flavicarpa*, foi obtido o primeiro mapa de ligação nessa espécie utilizando esses marcadores. Foram utilizados os acessos, IAPAR-123 e IAPAR-06, previamente usados por Carneiro (2002) e Lopes (2006) na formação de mapas de ligação com marcadores RAPD e AFLP, respectivamente. Os resultados mostram que não houve prejuízo na ordenação dos locos, quando comparados os mapas individuais e integrados de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, entretanto, existe a necessidade de se desenvolver mais marcadores microsatélites para a geração de todos os grupos de ligação de maracujá-amarelo, com boa acurácia. Referente aos estudos abordando a genética molecular em passifloras é necessário a geração de informações a cerca do conteúdo de DNA, tamanho do genoma, isolamento e clonagem de genes que controlam caracteres de interesse agrônômico, mecanismo genético que leva à incompatibilidade e mapas de ligação saturados (OLIVEIRA, 2006).

2.4.2. Transferibilidade de *primers* microssatélites

A transferibilidade de *primers* microssatélites entre espécies relacionadas é a consequência da homologia das regiões flanqueadoras das repetições microssatélites. Portanto, é possível aplicar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie, e empregá-los nas demais espécies do gênero (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). A capacidade para transferir e aplicar o mesmo conjunto de *primers* microssatélites em diferentes espécies pode facilitar estudos entre táxon relacionados ou endêmicos, uma vez que um dos grandes entraves para a utilização dos marcadores microssatélites é o grande volume de trabalho necessário para o desenvolvimento de *primers* específicos para loci de repetições microssatélites.

Uma revisão em três reinos (plantas, animais, fungos), cujas espécies têm sido submetidas à amplificação heteróloga de *primers* microssatélites relata que a transferibilidade de marcadores microssatélites ocorre de forma desigual entre os táxons (BARBARÁ et al., 2007). Reptéis, pássaros, mamíferos e invertebrados ou outros artrópodes se mostraram, claramente, mais transferíveis entre gêneros e até famílias. Estes autores apontam que existe um padrão evidente na amplificação em plantas, principalmente em eudicotiledôneas, entretanto, quando comparados com animais, apresenta taxa de transferência inferior. Apesar disso, as plantas apresentam maior polimorfismo entre os táxons analisados (BARBARÁ et al., 2007). Em fungos o sucesso da taxa de transferência parece estar intermediário e dentro do padrão dos outros grupos. Uma solução para projetos que requerem maior quantidade de *primers* e a transferência mais extensiva em alguns organismos seria o desenvolvimento de SSR ancorados em genes, ou EST-SSR (*Expressed Sequence Tag – SSR*) (PEAKALL et al., 1998; VARSHNEY et al., 2005).

Apesar da conservação das regiões flanqueadoras dos microssatélites, interrupções nessas regiões e nos próprios microssatélites podem ocorrer. Na amplificação por sequenciamento de 31 *primers* em três espécies de *Glycine* foi observada alta frequência de interrupções na maioria dos microssatélites observados, onde a maioria das interrupções foi de dois pares de bases (PEAKALL et al., 1998). Eles assumiram que os SSR, inicialmente puros, sofreram modificações por mecanismos de transversão, transição, *in-del* de única base ou interrupções

mais complexas. Em referência às regiões flangeadoras, mutações de ponto bem freqüentes foram observadas nessas regiões.

Quando uma mutação, do tipo *in-del*, ou substituições, ocorre nas regiões que flanqueiam os microssatélites, que é complementar ao *primer*, o fragmento pode não ser amplificado, são os chamados alelos nulos (LEHMAN et al., 1996; BALLOUX et al., 1998). A não amplificação de locos microssatélites, quando transferidos para outras espécies, pode afetar, igualmente, todos os indivíduos de uma espécie. A ocorrência de alelos nulos complica a interpretação de dados de segregação devido ao heterozigoto que não pode ser identificado e às falhas nas reações de PCR que não podem ser detectadas (VARSHNEY et al., 2005). Alelos nulos indicam a presença de polimorfismo na seqüência que flanqueia a região repetida (LEHMANN et al., 1996).

Vários fatores interferem na amplificação e polimorfismo entre táxons diferentes. Estes incluem desenho do *primer*, a qualidade e o número de amostras de DNA das espécies alvo analisadas, e o método utilizado para visualização em gel (PRIMMER et al., 2005). Um problema intrínseco aos microssatélites, comumente encontrado na literatura, e que dificulta a interpretação dos locos, é o fenômeno conhecido como homoplasia. A homoplasia é um problema quando se trabalha com marcadores microssatélites, porque alelos considerados idênticos em estado, não necessariamente são idênticos por descendência (ESTOUP et al., 2002; ANMARKRUD et al., 2008). Uma alternativa para confirmar se o loco microssatélite homólogo foi reproduzido seria hibridizar o produto final amplificado com uma sonda de microssatélite correspondente a seqüência correta (PRIMMER et al., 2005). A confirmação de homologia por análises de seqüências é um método mais robusto, mas que, provavelmente, indicará uma falsa interpretação de amplificação em casos onde a região repetida, durante a evolução, foi interrompida, diminuindo ou aumentando o motivo microssatélite, e assim não seria possível a hibridização com sondas. Foi adotada uma metodologia similar na transferência de *primers* em espécies do gênero *Glycine*, entretanto, ao invés de utilizar sondas com homologia às seqüências de microssatélites, produto amplificado foi seqüenciado, observando-se alta freqüência de interrupções na maioria dos SSR, aumentando e diminuindo os alelos microssatélites (PEAKAL et al., 1998).

Primers microssatélites desenvolvidos em arroz (*Oryza sativa*) foram transferidos para trigo (*Triticum aestivum*) buscando por marcadores ligados à resistência à fusariose (CARVALHO, 2007). *Primers* desenvolvidos para cacau (*Theobroma cacao*) foram aplicados em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) com a finalidade de caracterizar populações naturais e de germoplasma de cupuaçuzeiro (ALVES, 2007). Outros estudos vêm sendo conduzidos utilizando-se de *primers* heterólogos em plantas (KULEUNG, et al., 2004; TEHRANI et al., 2008; FERES et al., 2009; NG et al., 2009; PINHEIRO et al., 2009; WÜNSCH, 2009), animais (RODRIGUES et al., 2006; LEITE et al., 2007; STEEVES et al., 2008) e fungos (HAYDEN et al., 2004; GOODWIN et al., 2007).

A literatura tem descrito altas taxas de transferibilidade de locos microssatélites entre espécies aparentadas: *Fabaceae* (DAYANADAN et al., 1997), *Meliaceae* (WHITE E POWELL, 1997), espécies do gênero *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 1998), *Epidendrum* (Pinheiro et al., 2009) e *Salsola* (McGRAY et al., 2008). O mesmo não foi observado em espécies de animais como *Himantopus* (STEEVES et al., 2008) e *Halotis* (DIAZ-VILORIA et al., 2008). Níveis satisfatórios de transferibilidade foram observados para *primers* microssatélites de *Peromyscus polionotus subgriseus* em outras espécies, porém não houve sucesso ao se tentar utilizar esses *primers* na subespécie *Peromyscus polionotus leucocephalus* (PRINCE et al., 2002).

Em passifloras, a partir de *primers* microssatélites, previamente desenvolvidos para duas espécies, *P. edulis* f. *flavicarpa* (OLIVEIRA, 2006) e *P. alata* (PÁDUA et al., 2005), a amplificação cruzada em várias espécies de *Passiflora* silvestre vem sendo conduzidas. Utilizando 25 *primers* microssatélites desenvolvidos para *P. edulis* f. *flavicarpa* foi realizada e diferentes taxas de transferência foram observadas (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008a; CONCEIÇÃO et al., 2009). A taxa de transferibilidade de *primers* desenvolvido em *P. alata* em quatro espécies de *Passiflora* mantidas no BAG-Passifloras da UESC foi avaliada. Os resultados demonstraram taxas de amplificação cruzada que variou de 28% a 86% (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008b).

O desenvolvimento de *primers* para *P. alata* e *P. pohllii* foi utilizado para verificar a taxa de transferência para cerca de 80 espécies de *Passifloras* (PÁDUA, 2004). Os *primers* desenhados, a partir de clones de *P. alata*, amplificaram

seqüências de microssatélites em 35 espécies, enquanto que para *P. pohlii* amplificaram em média 41,1 espécies. Outro fato observado foi que *primers* construídos a partir de *P. pohlii* foram capazes de amplificar produtos em *P. alata*, entretanto, o contrário não foi observado.

2.4.3. Aplicação dos SSR na caracterização em bancos de germoplasma

Várias culturas que são preservadas em BAGs vêm sendo caracterizadas por meio de marcadores moleculares, principalmente os microssatélites ou SSR. A necessidade da conservação dos recursos genéticos vegetais tem sido amplamente aceita (SARIKAMIŞ et al., 2010). A avaliação por microssatélites contribui para prevenção de possíveis perdas genéticas, como as que podem acontecer durante as multiplicações dos acessos coletados, além de possibilitarem o estabelecimento dos sítios ou áreas coletadas que contenham maior variabilidade (HOSHINO et al., 2002).

Cultivares de *Prunus armeniaca*, conservados no Horticultural Research Institute – Turquia, provenientes de vários lugares, foram analisados por meio de marcadores microssatélites, demonstrando-se úteis para o manejo de germoplasma de *Prunus*, e cujos resultados podem ser comparados diretamente com outros estudos similares, realizados na mesma espécie, e utilizando os mesmos marcadores SSR (AKPINAR et al., 2010). Quarenta genótipos de *Pisum sativum*, dos quais 30 oriundos de coletas em diferentes regiões e 10 cultivados comercialmente foram, igualmente, analisados por 10 locos microssatélites revelando relação genética entre os genótipos; tais informações podem ser usadas para conduzir estudos de melhoramento e manejo do germoplasma analisado (SARIKAMIS et al., 2010). No entanto, é necessário atentar para o parentesco estreito e a falta de diversidade genética que ocorrem em alguns BAGs, e que podem prejudicar o progresso dos programas de melhoramento (QUIN et al., 2006). Portanto, é importante ampliar as bases genéticas e acentuar o conteúdo gênico das espécies que são usadas como recursos genéticos.

Em soja (*Glycine max*), várias pesquisas foram e vêm sendo realizadas por meio de marcadores microssatélites, para identificação e caracterização de cultivares presentes em coleções de germoplasma (ALCÂNTARA NETO, 2001; ALCÂNTARA NETO, 2005; PRIOLLI et al., 2006; VIEIRA et al., 2009). Tanto em culturas de espécies conhecidas, quanto de outras espécies, menos cultivadas, o

uso de marcadores microssatélites tem sido muito freqüente. Em milheto (*Pennisetum glaucum*), cultura que vêm substituindo o milho, a soja e o sorgo na alimentação de vários animais, marcadores microssatélites foram desenvolvidos, possibilitando a condução de análises de diversidade genética para essa espécie (BUDAK et al., 2003; UPADHYAYA et al., 2009).

Caracterizando genótipos de *Vaccinium* spp (mirtilo), através de marcadores moleculares, foi demonstrado que, com apenas três marcadores microssatélites foi possível definir o padrão das cultivares estudadas, o que corrobora a eficiência da técnica de marcadores microssatélites na caracterização de genótipos dessa espécie (ANJOS; SILVA et al., 2008). Em *Theobroma cacao*, os marcadores microssatélites foram aplicados para construir *fingerprinting* para todos os acessos de cacao da coleção de USDA-ARS, em Mayaguez, Porto Rico, a fim de verificar a identidade genética dos acessos e estimar a diversidade genética da coleção do germoplasma (IRISH et al., 2010).

A caracterização molecular de cultivares de *Prunus persica* foi alcançada utilizando marcadores microssatélites, cujos resultados permitiram a separação dos grupos distintos, os de consumo *in natura* e os industrializados, havendo concordância entre os dados genealógicos e os dados gerados pelos microssatélites (BIANCHI et al., 2004). A distância genética entre 36 acessos numa coleção de *Triticum aestivum* usando 33 marcadores microssatélites permitiu confirmar a alta variabilidade disponível de germoplasma de trigo, adaptada para uso no Brasil, sendo viável explorar essa ampla variabilidade em populações segregantes nos programas de melhoramento de trigo (SCHUSTER et al., 2009).

A eficiência da caracterização dos acessos de germoplasma é regida pela escolha da metodologia adequada na identificação dos indivíduos. Marcadores do tipo microssatélites são uma ferramenta valiosa para análise da variabilidade genética presente em germoplasma de espécies vegetais e, conseqüentemente, para a sua manutenção (HOSHINO et al., 2002). Estudos dessa natureza possibilitam inferências e dão uma idéia da variabilidade do germoplasma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Seis espécies de *Passiflora*, algumas com diferentes acessos, foram analisadas (Tabela 1). O germoplasma de estudo é originário de coletas realizadas em fragmentos da Mata Atlântica do sul da Bahia, além de acessos doados por Instituições de pesquisas do Brasil.. As espécies foram identificadas pelo taxonomista e mantidas no IAC (Instituto Agrônomo), Campinas, São Paulo, e da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná. As espécies são mantidas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Passifloras) da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil (long 39° 10' W, lat 14° 39' - S, alt 78 m), em casa de vegetação rústica 6x7x39 m, do tipo semi-arco, com cobertura plástica aditivada contra raios UV, revestida com sombrite 30%

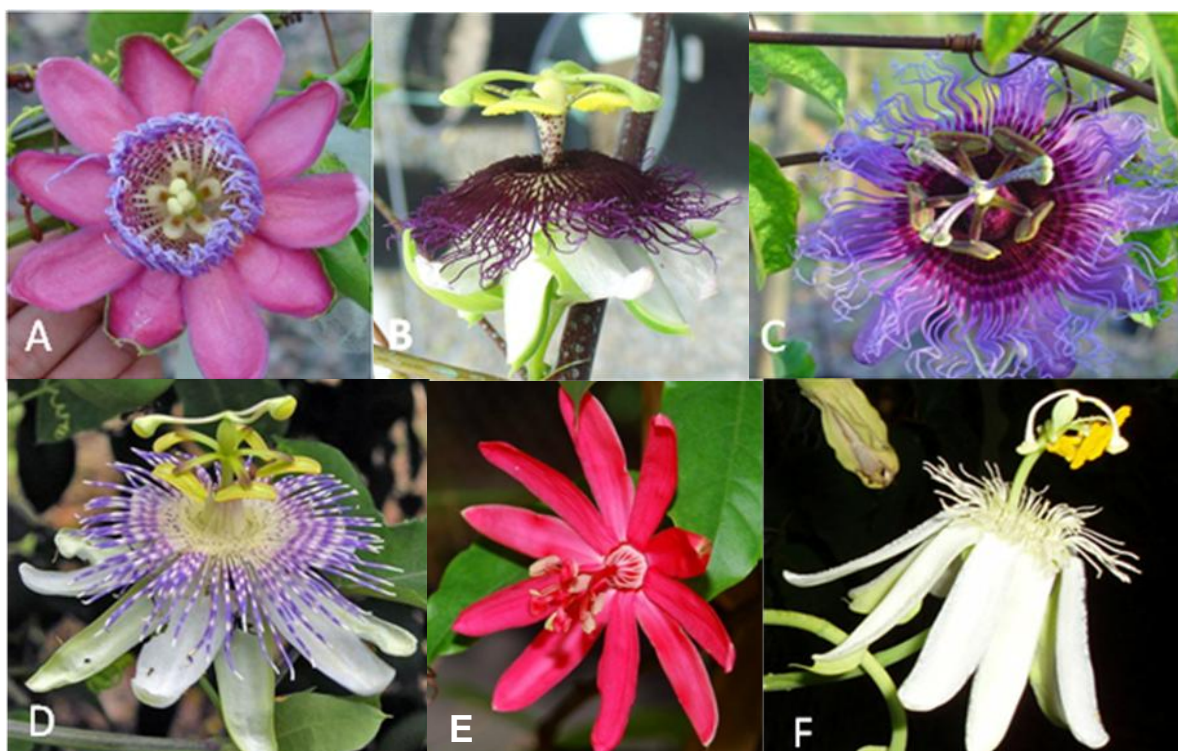


Figura 1: Flores de espécies de *Passiflora*. A) *Passiflora alata*; B) *P. cacaoensis*; C) *P. cincinnata*; D) *P. gibertii*; E) *P. glandulosa* e F) *P. mucronata*.

Tabela 1 – Espécies de *Passiflora* L. analisadas por marcadores microssatélites e mantidas no Banco Ativo de Germoplasma da (BAG-Passifloras) UESC.

Espécie	N° do acesso	Procedência	Obtenção
<i>P. alata</i> Curtis	101, 102, 104, 242, 244, 245, 317, 53	Sem informação	Doação
<i>P. alata</i>	54, 55, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 86, 88, 109, 114, 115	Camacan, Serra Bonita - BA	Coleta
<i>P. alata</i>	25, 39, 312	Instituto Plantarum	Doação
<i>P. alata</i>	59, 60, 85, 87, 359	Fazenda Ouro Verde, Una - BA	Coleta
<i>P. cacaoensis</i> Bernacci & Souza	344, 346, 347, 348	Serra Bonita, Camacan - BA - BA	Coleta
<i>P. cincinnata</i> Mast.	199	Sem informação	Doação
<i>P. cincinnata</i>	42, 52	Pato de Minas – MG	Doação
<i>P. cincinnata</i>	334	Fazenda Ouro Verde, Una - BA- BA	Coleta
<i>P. gibertii</i> N.E. Brown	171, 172, 173, 174	Embrapa Cerrados	Doação
<i>P. glandulosa</i> Cav.	G02, G03, G04, G05, G06, G07	Fazenda Ouro Verde, Una - BA- BA	Coleta
<i>P. mucronata</i> Lam.	127, 128, 129, 130	Praia do Aeroporto, Ilhéus- BABA	Coleta

3.2. Extração e quantificação de DNA genômico

Amostras de folhas jovens foram submetidas à extração do DNA imediatamente após a coleta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA 1995). O protocolo utilizado para extração foi o de Doyle e Doyle (1990) e todas as extrações foram feitas em duplicata. As amostras de tecido foliar foram maceradas utilizando-se nitrogênio líquido e após a maceração foi adicionado 900 µl de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 molL⁻¹; EDTA 20 molL⁻¹, pH 8,0; Tris HCl 100 molL⁻¹, pH 8,0; 0,2% de β-mercaptoetanol).

A ressuspensão do pellet foi realizada adicionando-se 50 a 100 µL de tampão TE (10 molL⁻¹, Tris-HCl pH 8,0; 1 molL⁻¹ EDTA pH 8,0) contendo 10 µg/mL de RNase. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 a 50 minutos até a solubilização (ressuspensão) total do *pellet*. Para estimar a quantidade de DNA total extraído, foram empregadas duas formas de quantificação, utilizando gel de agarose a 0,8% e espectrofotômetro (SAMBROOK et al., 1989). A visualização do gel de agarose foi realizada em fotodocumentador ImageQuant 350 GE Healthcare. Para a espectrofotometria foi utilizado o modelo GeneQuant *pro* da GE Healthcare. Após a quantificação do DNA extraído, as amostras foram todas padronizadas para uma concentração final de 5ng/µL e estocadas à -20°C.

3.3 Marcadores microssatélites

3.3.1. *Primers* e ampliações via PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para este estudo foram utilizados 30 pares de *primers* microssatélites, sendo 23 previamente desenvolvidos para *P. edulis* f. *flavicarpa* e sete desenvolvidos para *P. alata* (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – *Primers* microssatélites desenvolvidos para *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg. (OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2005) e utilizados no presente trabalho.

Código do <i>primer</i>	TA	Mix	Seqüência do <i>primer</i>	Motivo	Tamanho esperado (pb)
PE01	TD56	7	F: CAGGATAGCAGCAGCAATGA	(GT)7	171
			R: AGCCAAATGTCAAACACTGAAC		
PE02	TD56	4	F: GGACGACAATCAAGTGAGG	(TG)7	215
			R: CCCAAACTATGCAACACCAA		
PE03	TD56	2	F: GCAGCGAGGGAAGAAAAA	(GA)10	156
			R: TGAGACATCGTGCGTGAA		
PE04	TD56	2	F: ATGCTTTTGGAAATCCGTTT	(TG)9	235
			R: TGCTCATGCAAAGTCACTGG		
PE06	TD56	4	F: AGCGGGGAGGAGAGTAGC	(CA)7	187
			R: GCCTGATGTCAAAAACACAG		
PE07	TD56	4	F: TGCTCATTGATGGTGCTTG	(GA)23	138
			R: TCGTCTCTTCTCCTCCTTCA		

TA – temperatura de anelamento do primer; TD – touchdown.

Tabela 2 (continuação) – Lista de pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg. (OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2005) e utilizadas no presente trabalho.

Código do <i>primer</i>	TA	Mix	Seqüência do <i>primers</i>	Motivo	Tamanho esperado (pb)
PE09	TD50	4	F: GGGCCTTTATCCATGTTTGA	((AT)5(AC)8	268
			R: GGAAATCCGAAAACCTGGTTG		
PE10	TD56	4	F: AACCTTGATCTCCAGCCTAT	(GA)34	234
			R: GTTTTCGCCCGCGTATT		
PE11	TD56	4	F: TTAACAGGACTTAGCACTTGA	(GT)11	178
			R: CTCATCCTTCTTCCATCTTTG		
PE27	TD56	2	F: TTGCTCATTGCACTCATCCT	(GT)7	139
			R: GCAGACATTTCCCTGGAGCA		
PE28	TD56	4	F: GCCACTAACGTAACTGTGCT	(CT)16	243
			R: CAAGCTCTTATTAGGCATCCA		
PE37	TD56	2	F: CAAAAGGATAGGCCTGATGTC	(TG)8	232
			R: TGCTTGGTCATCCACTGAAG		

TA – temperatura de anelamento do primer; TD – touchdown.

Tabela 2 (continuação) – Lista de pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para *Passiflora edulis* Sims.f. *flavicarpa* Deg. (OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2005) e utilizados nesse trabalho.

Código do <i>primer</i>	TA	Mix	Seqüência do <i>primer</i>	Motivo	Tamanho esperado (pb)
PE38	TD50	2	F: GATCGGTCCTCGGTTAGAC R: AGTCACACAGCATGAGAAATC	(TG)8	215
PE42	TD56	7	F:GTCACTTCATTCTTCCTTTCC R: TTAGCCCACTCAAACACAA	(GT)8	216
PE54	60*	2	F:TGGTGTGTGTGGGTGATTAG R: CATTCTCCTGCCACCTGAGT	(TG)7	176
PE59	TD50	7	F: GAACACTTCGCATGGCTAGA R:TTCCGAATCAAACCGTAACT	(ATCTA)3	276
PE60	TD50	4	F: TCCTCACCTTTGTTTATGCT R: AATGACCTATTTGAACCTGGA	(TG)12	139
PE64	TD50	4	F:ATCAATTCCGCACCCCAAAC R: GGAACGTCAATCAAGTGAGGA	(AC)8	228

TA – temperatura de anelamento do primer; TD – touchdown.

Tabela 2 (continuação) – Lista de pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg. (OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2005) e utilizados nesse trabalho.

Código do <i>primer</i>	TA	Mix	Seqüência do <i>primer</i>	Motivo	Tamanho esperado (pb)
PE66	TD56	2	F: CCATAGTCCCAACAAGCATC	(AC)9	165
			R: GCTGTGGACCCTAACTCAGTC		
PE75	TD56	7	F: CACAATCGGTGGGAAAGATA	(TG)17	178
			R: GTAGTTTTGGGCAGTTTGC		
PE90	TD56	2	F: TCAGGAAGATTGCATGTTAGT	(AGC)5	245
			R: CTGGGTTTTGTTTATGTTGC		

TA – temperatura de anelamento do primer; TD – touchdown.

Tabela 3. Relação de *primers* de *Passiflora alata* Curtis (PÁDUA et al., 2005).

Código do <i>primer</i>	Seqüência do <i>primer</i>	Motivo	Número de alelos (tamanho esperado em pb)	Acesso no GenBank
A01BP3	F: GCGGGATTCTCTTGCCTTAC R: ACAAACACATCAGCCACCA	(GA)11	3(161-167)	AY721695
A01FP3	F: AGAGTCGTCTAACCTCTTGC R: TCTTGCTTACGCGTGGACTA	(TGG)5	6(153-174)	AY721689
A03AP3	F: GCCTTAGCTTGCAACTTTCG R: GGAGGCAACCCGAGTATAAA	(CT)28	2(204-214)	AY721690
A06FP1	F: GGGCGGAAGAAAAGAGAAG R: GAAACACACGATGCGAAAA	(GAA)28	2(226-228)	AY721683
A07FP1	F: GAAGTGAAGGAGAAGAAGA R: CCCTCTGGTTGTCTACCTAC	(AAG)9	2(153-159)	AY721685
A08GP1	F: TAACCGACTTCGCCCACA R: GAGCAGGGGAAGAAAAGGA	(CT)50	5(97-109)	AY721686
A08FP1	F: CACATTTGCCGTCCTGG R: CGGCATACGATAAATCTCCTG	(TG)9	2(190-205)	AY721700

Foram utilizados três *mix* (Tabela 4) para otimização da reação de PCR conforme o *primer*, e três diferentes condições de amplificação em esquema *touchdown* com base nos programas TD56, TD54 e TD50 (OLIVEIRA, 2006) (Tabela 5).

Tabela 4 – Concentração dos reagentes e relação dos *mix* para otimização das reações de PCR de acordo com os *primers* microssatélites (OLIVEIRA, 2006).

Reagente	Mix 2	Mix 4	Mix 7
Tampão	1 X	2 X	1 X
<i>Primer</i> F+ R	0,3 µM	0,3 µM	0,3 µM
DNA	30 ng	30 ng	30 ng
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM	2,5 mM
dNTP	200 mM	200 mM	350 mM
Taq polimerase	0,5 U	0,5 U	0,5 U
Água Mili-Q	9,7 µL	7,7 µL	7,7 µL

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Tabela 5. Condições de amplificação para reações de PCR de acordo com os *primers* microssatélites (PÁDUA et al., 2005; OLIVEIRA, 2006).

Programa TD56			Programa TD54			Programa TD50		
Nº de Ciclos	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	5 min	1	94°C	5 min	1	94°C	5 min
8	94°C	40 s	12	94°C	40 s	12	94°C	40 s
	60°C - 0,5°C por ciclo	40 s		60°C - 0,5°C por ciclo	40 s		56°C - 0,5°C por ciclo	40 s
	72°C	50s		72°C	50s		72°C	50s
24	94°C	40s	20	94°C	40s	20	94°C	40s
	56°C	40s		54°C	40s		50°C	40s
	72°C	50s		72°C	50s		72°C	50s
1	72°C	5 min	1	72°C	5 min	1	72°C	5 min
1	8°C	α	1	8°C	α	1	8°C	A

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

3.3.2. Testes de transferibilidade e detecção dos fragmentos amplificados.

Os testes de transferências dos *primers* de *P. alata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* para as diferentes espécies foram feitos em quatro acessos de cada espécie, para que problemas de amplificação fossem evitados. O controle positivo (DNA da espécie para a qual foi desenvolvido o *primer*) e o controle negativo (sem DNA) foram aplicados concomitantemente com as amostras das espécies estudadas.

A visualização da condição de amplificação dos fragmentos via PCR foi realizada em gel de agarose a 3%. Nessa etapa foi verificada a taxa de transferibilidade dos *primers* e a qualidade das reações de transferência. Bandas inespecíficas, quando presentes, foram retiradas aumentando a temperatura de anelamento de 1 a 2°C, e nos produtos de amplificação que apresentaram baixa concentração, a temperatura de anelamento foi diminuída em 1°C.

Após verificar a amplificação positiva no gel de agarose a 3%, essas mesmas reações foram resolvidas no gel desnaturante de poliácridamida a 6% utilizando cuba de sequenciamento vertical SQ3 (Amersham Pharmacia Biotech). As amostras foram corridas nas condições de 30 mA de corrente elétrica, 30 W de potência e 1000V por 2h:30min. Os fragmentos obtidos foram detectados por coloração com nitrato de prata (AgNO₃) (BEIDLER et al. 1982, adaptado por CRESTES et al., 2001). Após a revelação, o gel foi deixado secar em temperatura ambiente e depois fotografado por máquina digital. Cerca de quatro a sete *primers* que tiveram a transferência confirmada em gel de acrilamida 6%, foram selecionados para a etapa de caracterização de cada grupo de espécies.

3.4. Estimativas da genética descritiva

Para a genotipagem da população, o tamanho do fragmento foi obtido no próprio gel, sendo as medidas tomadas com auxílio de uma régua. A seguir as, medidas em centímetros foram convertidas em pares de bases com auxílio do programa Table Curve 2D v2.0.0, tendo como referência o tamanho conhecido do marcador de 50 pares de bases. O conteúdo de informação do polimorfismo (PIC: *polymorphic information content*) para os locos analisados foi calculado utilizando o programa GDA versão 1.0 (LEWIS e ZAYKIN, 2001). Os valores de PIC foram classificados em três níveis: (a) altamente informativo (PIC > 0,5); (b)

moderadamente informativo ($0,5 < PIC > 0,25$); (c) pouco informativo ($PIC < 0,25$) (BOTSTEIN et al., 1980). Ainda utilizando o GDA versão 1.0, foi realizada estatística descritiva dos alelos por *primer* e por grupo de espécies, e, para tanto, se estimou parâmetros que medem a diversidade genética: número médio de alelos por locos (A), heterozigosidades médias observadas (H_O) e esperadas (H_E) e o índice de fixação intrapopulacional (F_{IS}) (WEIR; COCKERHAM, 1984).

3.5. Análise da variabilidade intraespecífica de *P. alata*

O estudo da diversidade intraespecífica foi realizado somente para a espécie *P. alata*, representada por 29 acessos. Os produtos gerados pela amplificação dos microssatélites foram considerados como marcadores dominantes, avaliando-se a presença e ausência de bandas microssatélites. Cada alelo microssatélite correspondeu a uma banda amplificada. As bandas amplificadas foram analisadas e uma matriz binária foi construída onde o valor 1 (um) é a presença de banda, e o valor 0 (zero) sua ausência. A partir dos dados binários, foi calculada a matriz de similaridade para todos os acessos, utilizando o coeficiente de similaridade de DICE. Foram realizadas análises de agrupamento utilizando o método aglomerativo de médias UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with an Arithmetic Mean*) e o procedimento de SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarquic Nonoverlapping*), utilizando o software NTSYSpc 2.0 (*Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 2000). Para a estimativa da significância da correlação entre a matriz de similaridade e a matriz de agrupamento, foi empregado o teste de comparação de matrizes de Mantel (MANTEL, 1967) com mil permutações, no programa NTSYSpc 2.1 (ROHLF, 2000), observado através da correlação cofenética (r).

4. RESULTADOS

4.1. Taxa de transferibilidade de *primers* microssatélites

No estudo da transferibilidade de 31 *primers* microssatélites para seis espécies presentes no BAG-Passifloras da UESC foram transferidos entre sete e 18 *primers* microssatélites por espécie (Tabela 6). Dos sete *primers* desenvolvidos para genótipos de *P. alata*, quatro produziram ampliações típicas dos microssatélites nos acessos de *P. alata* do BAG e nenhum amplificou para as espécies *P. glandulosa* e *P. mucronata*. Dos 24 *primers* obtidos a partir de genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, a espécie *P. cacaoensis* foi a que apresentou maior porcentagem de amplificação (63,5 %)

As espécies *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. mucronata* apresentaram a mesma porcentagem de amplificação (37,5%). Entretanto, foi observado que a maioria dos *primers* não apresentou resultados de ampliações em comuns para as espécies avaliadas. Além disso, alguns *primers* foram descartados devido à inconsistência na amplificação, resultado da baixa intensidade de amplificação. Outro motivo para eliminação de *primers* foi a presença de bandas inespecíficas, mesmo com o aumento da temperatura quando analisados em géis de acrilamida, o que poderia dificultar a identificação dos locos de microssatélites correspondentes.

Tabela 6. Resultados de amplificação cruzada dos 31 locos analisados para seis espécies silvestres de *Passiflora* em gel de agarose a 2,5 %. *Primers* desenvolvidos para *P. alata* (A01BP3 a A08FP1) e *P. edulis* (pe01 a pe90).

<i>Primers</i>	<i>P. alata</i>	<i>P. cacaoensis</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. gibertii</i>	<i>P. glandulosa</i>	<i>P. mucronata</i>
A01BP3						
A01FP3						
A03AP3						
A06FP1	1					
A07FP1	1	1	1	1		
A08GP1	1					
A08FP1	1	1		1		
T (%)	57,1	28,5	14,4	28,5	0	0
pe01		1	1		1	
pe02		1			1	
pe03						
pe04		1				1
pe05						1
pe06		1			1	1
pe07	1	1	1		1	1
pe08	1		1			
pe09				1		
pe10		1				
pe11		1				1
pe27	1		1			

Tabela 6 (continuação). Resultados de amplificação cruzada dos 31 locos analisados para seis espécies silvestres de *Passiflora* em gel de agarose a 2,5 %. *Primers* desenvolvidos para *P. alata* (A01BP3 a A08FP1) e *P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg. (pe01 a pe90).

<i>Primers</i>	<i>P. alata</i>	<i>P. cacaoensis</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. gibertii</i>	<i>P. glandulosa</i>	<i>P. mucronata</i>
pe28					1	
pe37	1	1		1		1
pe38		1		1	1	
pe42		1				
pe54		1		1		1
pe58		1		1	1	1
pe59		1				
pe60						
pe64			1			
pe66		1				1
pe75	1	1	1	1		1
pe90		1		1		
T (%)	37,5	62,5	37,5	37,5	29,1	37,5

T (%)- taxa de transferibilidade. Espaço vazio - não amplificação; 1 - amplificação observada.

Para cada *primer* amplificado foi obtida a porcentagem de amplificação em todas as seis espécies estudadas (Tabela 7). Os *primers* pe07 e pe75 foram os que apresentaram maior porcentagem de transferibilidade (87,7%). Dos sete *primers* obtidos de *P. alata*, três não amplificaram em nenhuma das espécies estudadas, entretanto, os *primers* A07FP1 e A08FP1 exibiram transferibilidade de 71,4% e 57,1%, respectivamente.

Tabela 7. Taxas de transferibilidade observadas como presença de produtos de PCR em gel de agarose, com os *primers* isolados de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*, em espécies silvestres de *Passiflora*.

<i>Primer</i>	T (%)
pe07, pe75	87,7
A07FP1	71,4
A08FP1, pe37, pe58	57,1
pe01, pe02, pe04, pe06, pe11, pe27, pe54, pe66	42,8
pe08, pe38, pe59, pe64	28,5
A06FP1, A08GP1, pe03, pe10, pe28, pe42, pe90, pe05	14,2
A01BP3, A01FP3, A03AP3	0

T(%) – taxa de transferibilidade.

O padrão de amplificação, utilizando os *primers* selecionados variou entre as espécies. O critério de amplificação considerado para a interpretação da taxa de transferibilidade foram confirmados em gel de poliacrilamida a 6%, tanto para amplificações nítidas, quanto para amplificações fracas (Figuras 2 e 3). Bandas de amplificação inespecíficas foram visualizadas com o *primer* pe06 (Figura 3) em todos os seis acessos da espécie *P. glandulosa*. O perfil ótimo de amplificação de *primers* microsatélites foi verificado nos acessos da espécie de *P. alata* (Figura 4).

O acesso 80 não apresentou produto amplificado para o *primer* indicado. Para esses acessos que não apresentaram amplificação, foi repetido o ensaio de PCR utilizando DNA do mesmo acesso, porém obtido numa outra extração, tendo o resultado persistido. Esta etapa é de extrema importância para eliminar artefatos de PCR antes de se caracterizar os acessos.

4.2. Caracterização dos locos de *Passiflora* utilizados

Em todos os locos analisados em gel de poliacrilamida a 6 %, o tamanho da seqüência de microssatélites foi discrepante ao do obtido a partir do genótipo o qual foi desenvolvido o *primer* (Tabela 8). A maioria dos locos exibiu tamanho maior que o esperado, entre nove e 462 pares de bases. Os acessos de *P. alata* mesmo sendo amplificados com *primers* específicos para a espécie, apresentaram locos com tamanhos acima do esperado entre 185 a 405pb. Entretanto, alguns exibiram seqüências amplificadas de tamanho menor do que o esperado, a exemplo, pe01 que apresentou cerca de 160 e 192 pares de bases e pe04 exibindo 98 a 111 pares de bases, ambos amplificados em *P. cacaoensis*, e em *P. glandulosa* o pe27 exibiu ampliações com fragmentos 125 pares de bases.

Todos os locos mostraram diferenças no tamanho do alelo amplificado, quando observados em espécies diferentes. Por exemplo, em *P. alata*, *P. glandulosa* e *P. cincinnata*, o *primer* pe27 exibiu tamanhos discrepantes de 295-370pb, 125pb e 362-379, respectivamente. O mesmo se repetiu para os *primers* pe37, pe07, pe90, pe04, pe75, pe54 nas diferentes espécies para as quais foram transferíveis (Tabela 8).

Os parâmetros de diversidade genética e de Nei, obtidos entre as espécies, não foram estimados, pois não houve coincidência de *primers* (locos) amplificados para todas as espécies. Portanto, foi realizada apenas a análise de diversidade intraespecífica.

Tabela 8. Descrições dos locos de microssatélites de *Passiflora* usados para análise de espécies silvestres do mesmo gênero, quanto ao tamanho de fragmentos amplificados (pb) esperados e observados.

Espécie	Primer	Tamanho esperado (pb)	Tamanho observado (pb)
<i>P. alata</i>	pe27	139	295-370
	A07FP1	153-159	197-344
	A08FP1	190-250	475-656
	pe37	232	567
	A06FP1	226-228	456-493
	pe75	178	410-494
<i>P. cacaoensis</i>	pe01	171	192-160
	pe04	235	111-98
	pe54	176	398
	pe66	165	640-615
	pe90	245	623
	pe42	216	248
<i>P. mucronata</i>	pe04	235	586-542
	pe07	138	720-600
	pe11	178	410-578
	pe42	216	322-344
	pe54	176	317-588
	pe05	211-223	312-355
	pe37	232	568
<i>P. glandulosa</i>	pe02	215	588
	pe06	187	55-196
	pe07	138	241-83
	pe37	232	597
	pe27	139	125
	pe90	245	554-392
<i>P. cincinnata</i>	pe07	138	454
	pe27	139	379-362
	pe37	232	528
	pe75	178	401
	pe90	245	584
<i>P. gibertii</i>	pe37	232	524
	pe54	176	357
	pe75	178	404-378
	pe90	245	357

Quanto às estimativas de diversidade genética para cada loco, A06FP1 e pe27 foram o que apresentaram maior quantidade de alelos (A), cinco no total, ambos analisados no grupo de acessos de *P. alata* (Tabela 9). Entretanto, o locus pe27 exibiu números diferentes de alelos, quando observados em outras espécies, dois em *P. cincinnata* e um em *P. glandulosa*. O mesmo foi observado em outros locos pe07, pe42, pe75 e pe90. O pe37 e pe54 apresentaram apenas um alelo em todas as espécies as quais foram analisadas.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou entre 0,0 e 1,0 para todos os locos em todas as espécies. Quanto à heterozigosidade observadas (H_O) e esperadas (H_E), o loco que apresentou maior H_O foi o A06FP1 (0,78), quando observado na população de *P. alata*. O valor de H_E (0,71), para o mesmo loco, se mostrou com valor inferior a H_O , assim como para a maioria dos locos, exceto para o pe27. Na população de *P. cincinnata*, pe27 apresentou valores de H_O e H_E de 0,25 e 0,53, respectivamente. Os valores de F_{IS} , que medem o nível de estrutura genética entre os indivíduos da população, variaram entre zero e 16 locos analisados, com valores negativos para 10 locos e positivos para oito locos.

A diversidade alélica do loco pe27, observada no grupo de acessos de *P. alata*, foi maior e discrepante, quando comparado ao grupo de acessos de *P. cincinnata* e *P. glandulosa*, o que proporcionou diferentes freqüências alélicas. O mesmo foi observado para o loco pe75 nas populações de *P. alata*, *P. cincinnata* e *P. gibertii*. O loco A06FP1 apresentou alta diversidade alélica na espécie *P. alata*, cujos acessos foram os únicos a apresentarem produto de amplificação para este loco. Entretanto, o pe37, comum para as populações de *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. glandulosa*, manteve o mesmo perfil de freqüência e diversidade alélica.

Tabela 9. Estimativa de parâmetros genéticos em cada loco, em diferentes espécies de *Passiflora* silvestres.

População	Loco	A	PIC	H _O	H _E	F _{IS}
<i>P. alata</i>	A06FP1	5	1	0,78	0,71	-0,09
	A07FP1	3	1	0,67	0,47	-0,28
	A08FP1	4	1	0,62	0,43	-0,43
	pe27	5	1	0,17	0,17	0,37
	pe37	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe75	4	1	0,27	0,35	0,23
<i>P. cacaoensis</i>	pe01	2	1	1	0,57	-1
	pe04	2	1	1	0,57	-1
	pe42	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe54	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe66	2	1	1	0,57	-1
	pe90	1	0	0,0	0,0	0,0
<i>P. mucronata</i>	pe04	2	1	1	0,57	1
	pe05	2	1	1	0,57	1
	pe07	2	1	0,25	0,25	0,0
	pe11	2	1	1	0,57	1
	pe37	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe42	2	1	1	0,57	1
	pe54	2	1	0,0	0,57	1
<i>P. glandulosa</i>	pe02	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe06	2	1	1	0,54	-1
	pe07	2	1	1	0,54	-1
	pe27	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe37	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe90	3	1	1	1	-0,71
<i>P. cincinnata</i>	pe07	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe27	2	1	0,25	0,53	0,57
	pe37	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe75	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe90	1	0	0,0	0,0	0,0
<i>P. gibertii</i>	pe37	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe54	1	0	0,0	0,0	0,0
	pe75	2	1	1	0,57	-1
	pe90	1	0	0,0	0,0	0,0

A- número de alelos por loco; PIC- conteúdo de informação de polimorfismo; H_E- heterozigosidade média esperada; H_O- heterozigosidade média observada; F_{IS}- índice de fixação intrapopulacional.

4.3. Caracterização das espécies

Com base na amplificação dos locos de microssatélites utilizados, a espécie que apresentou maior número médio de alelos por loco (A) foi *P. alata* (3,33), enquanto *P. cincinnata* apresentou o menor valor (1,20) (Tabela 10). O conteúdo de informação do polimorfismo (PIC), que mensura os locos polimórficos, foi maior em *P. mucronata* (0,85) e menor em *P. cincinnata* (0,20), valores estes que correspondem aos obtidos pelas estimativas do número médio de alelos por loco (A). A heterozigosidade observada (H_O), no conjunto das cinco espécies, variou de 0,75 em *P. mucronata* e 0,25 em *P. gibertii*. Os valores de heterozigosidade esperado (H_E), quando comparados com a H_O , se revelaram menores para todas as espécies, sendo o maior valor de H_E de 0,44 em *P. mucronata* e o menor de 0,10 em *P. cincinnata* (Tabela 10). Esses maiores valores de H_O , em relação a H_E , indicam o excesso de heterozigotos. O índice de fixação intrapopulacional médio (F_{IS}) de todas as espécies foi negativo, exceto para *P. cincinnata* que apresentou um alto valor (0,57), estando sobre influência de apenas um loco, o pe27. A análise de frequência alélica de todos os grupos (Tabela 11) possibilitou demonstrar que os grupos de espécies apresentaram níveis de riqueza alélica distintos.

No grupo de acessos de *P. alata*, observou-se que quatro locos, A6FP1, A08FP1, pe27 e pe75, contribuíram significativamente para expor a diversidade contida nessa população (Tabela 5). Para o loco A06FP1, pode-se observar que os acessos 54, 78, 81, 82, 86, 88, 109, 114 e 115 mostraram-se polimórficos para os mesmos alelos (Figura 6A). Apesar desses acessos terem sido coletados em Camacan, BA, foram todos provenientes de sementes. O grupo de indivíduos da espécie *P. glandulosa* e *P. cacaoensis*, do mesmo modo, não apresentou variação intraespecífica para nenhum dos locos analisados, pois uma vez que se observava a presença de heterozigotos, essa condição se repetia para todos os acessos.

Tabela 10. Estimativa de parâmetros genéticos em cinco populações de *Passiflora* mantidas no BAG-Passifloras da UESC.

População	N	A*	PIC*	Ho*	He*	F _{IS} *
<i>P. alata</i>	29	3,33	0,83	0,39	0,35	-0,11
<i>P. cacaoensis</i>	4	1,5	0,5	0,5	0,28	-1
<i>P. mucronata</i>	4	1,85	0,85	0,75	0,44	-0,9
<i>P. glandulosa</i>	6	1,66	0,5	0,5	0,28	-0,89
<i>P. cincinnata</i>	4	1,2	0,2	0,5	0,1	0,57
<i>P. gibertii</i>	4	1,25	0,25	0,25	0,14	-1

N – número de indivíduos na população; A- número médio de alelos por loco; PIC – Conteúdo de Informação do Polimorfismo; H_E- heterozigosidade média esperada; H_O- heterozigosidade média observada; F_{IS}- índice de fixação intrapopulacional. * Valores médios.

Tabela 11. Frequências alélicas de cinco populações de *Passiflora* silvestres por locos microssatélites.

Loco	Alelo	População					
		<i>P. alata</i>	<i>P. cacaoensis</i>	<i>P. cincintha</i>	<i>P. gibertii</i>	<i>P. glandulosa</i>	<i>P. mucronata</i>
pa04	1	0,035	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	3	0,428	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,107	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	5	0,267	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
pa05	1	0,178	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	3	0,696	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
pa07	1	0,130	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,689	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
pe01	1	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000
pe02	1	0,000	0,500	0,000	0,000	1,000	0,000
	2	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000
pe04	1	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,500
	2	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,500
pe06	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000
pe07	1	0,000	0,500	1,000	0,000	0,500	0,500
	2	0,000	0,500	0,00	0,000	0,500	0,500
pe11	1	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,500
	2	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,500

Tabela 11 (continuação). Frequências alélicas de cinco populações de *Passiflora* silvestres por locos microssatélites.

Loco	Alelo	População					
		<i>P. alata</i>	<i>P. cacaoensis</i>	<i>P. cincinnta</i>	<i>P. gibertii</i>	<i>P. glandulosa</i>	<i>P. mucronata</i>
pe27	1	0,017	0,000	0,375	0,000	1,000	0,000
	2	0,017	0,000	0,625	0,000	0,000	0,000
	3	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,035	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	5	0,910	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
pe37	1	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000
pe42	1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,500
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500
pe54	1	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
pe66	1	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000
pe75	1	0,068	0,000	1,000	0,500	0,000	0,000
	2	0,120	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000
pe90	1	0,000	1,000	1,000	1,000	0,080	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,410	0,000
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000

Os produtos amplificados com os *primers* utilizados apresentaram algumas ampliações inespecíficas e outras com bandas típicas de microssatélites (Figuras 4 a 6).

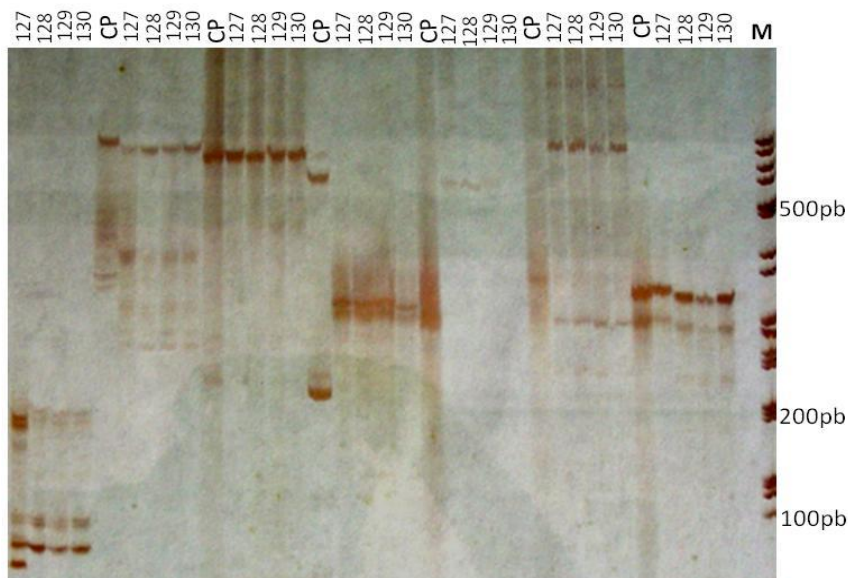


Figura 4. Gel de poliacrilamida 6 % em acessos da população de *P. mucronata* mostrando baixa variabilidade entre acessos, por microssatélites. Acessos 127, 128, 129, 130, amplificados com os *primers* pe07, pe11, pe37, pe42, pe75, pe54 e A07FP1, respectivamente. M- marcador de 50pb; CP- controle positivo.

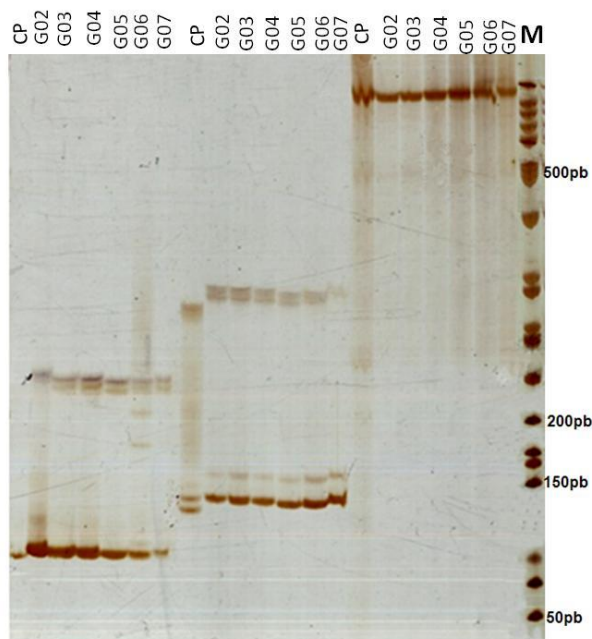


Figura 5. Gel de poliacrilamida 6 % em acessos da população de *P. glandulosa* exibindo pouca variabilidade entre os acessos, por microssatélite. Na ordem tem-se o controle positivo na primeira canaleta de cada *primer* analisado com os acessos G2, G3, G4, G5, G6, G7. Sequência de *primers*: pe07, pe27, pe37. M- marcador de 50pb. CP- controle positivo

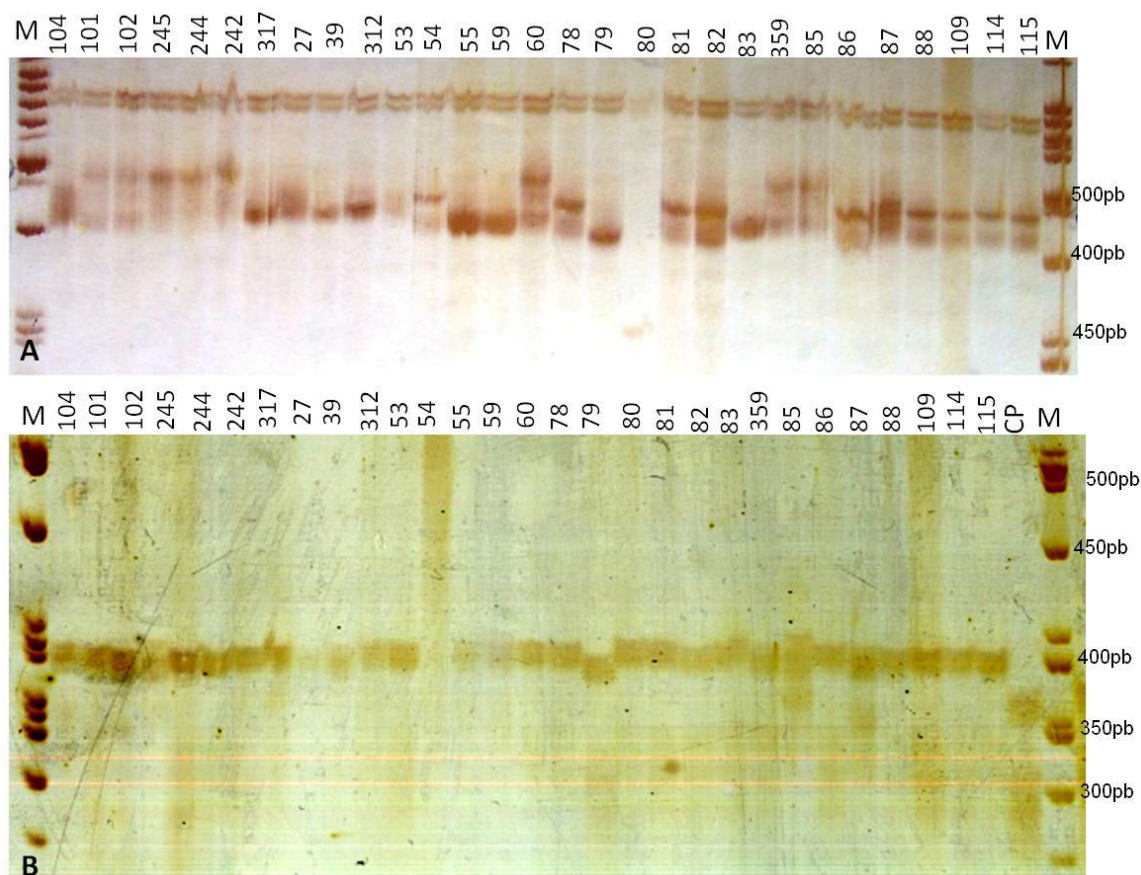


Figura 6. Gel de poliacrilamida 6 %. Genotipagem em população de *P. alata* com 29 acessos A) *primer* A6FP1, evidenciando polimorfismo entre alguns acessos provenientes de coletas realizadas em um mesmo local. B) *primer* pe27 exibindo baixo polimorfismo entre os mesmos acessos e o controle positivo apresentando tamanho de fragmento menor do que os genótipos amplificados. M- marcador de peso molecular 50pb; CP- controle positivo.

4.4. Análise da variação intraespecífica de *P. alata*

O estudo intraespecífico realizado entre os acessos de *P. alata* foi obtido com seis locos microssatélites, que revelaram 18 alelos, sendo que, entre os locos analisados apenas o pe37 apresentou-se monomórfico. A similaridade média obtida foi de 0,74; a máxima observada foi de 1,00 e a mínima de 0,47. O coeficiente de correlação cofenético r de 0,78 sugere um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias, gerado por meio do método aglomerativo UPGMA, e sua matriz original. O valor cofenético mostrou-se significativo pelo teste de Mantel ($p[Zrdmd \leq Zobs] = 1,000 / t\text{-teste} = 10,2716$) e alto, uma vez que valores de $r \geq 0,56$ é considerado ideal (VAZ PATTO et al., 2004).

A representação gráfica do agrupamento dos indivíduos formou claramente três grupos (Figura 7), que foram obtidos através do ponto de corte calculado pela similaridade média = 0,74 (ANJOS; SILVA et al., 2010; AMORIM et al., 2009). No grupo designado I, formado por dezessete acessos, os quais incluem a maioria dos coletados em Camacan – BA e Una – BA, os indivíduos 54, 55, 82 e 87, não houve diferença genética entre eles (similaridade=1,00) No grupo designado II, formado por 10 acessos, foram observados indivíduos com dados genotípicos idênticos para os locos analisados, os acessos 102 e 244, e os acessos 312 e 53. Os indivíduos desse grupo compreendem aqueles os quais as informações do local de coleta não foram documentadas e todos os acessos foram obtidos por doações do Instituto Plantarum. O grupo designado III foi composto por apenas dois acessos. Esse grupo divergiu, significadamente, dos demais agrupamentos (Figura 7). Em alguns dos grupos formados, não foi observada relação entre o local ou origem de coleta e a similaridade genética. Fato esse, observado no agrupamento III, formado por dois acessos de origens diferentes e que apresentaram valores baixos de similaridade se comparados com os grupos I e II (Figura 7).

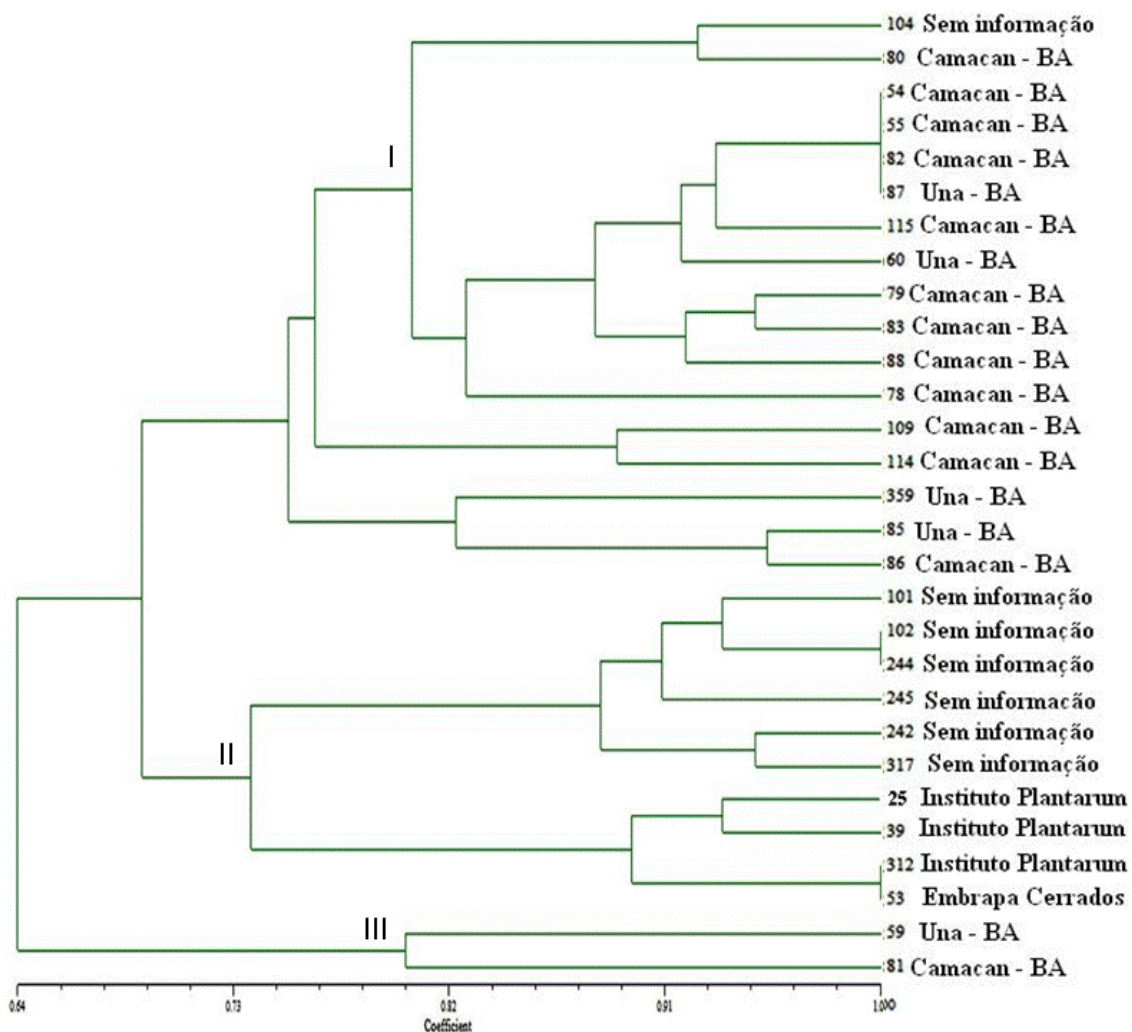


Figura 7. Dendrograma resultante da análise do agrupamento de 29 genótipos de *P. alata*, obtido pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Dice. O valor do coeficiente de correlação cofenética r é de 0,84.

5. DISCUSSÃO

As taxas de transferibilidade apresentadas foram satisfatórias para a maioria das plantas e dos *primers* estudados. A maioria dos *primers* exibiu a taxa de 42,8% de amplificação. A análise da transferibilidade de *primers* obtidos a partir de genomas de *P. alata* e *P. pohlii*, em 80 espécies silvestres de *Passiflora*, verificou-se maior porcentagem de amplificação (78,75 %) do *primer* A08FP1, desenvolvido para *P. alata* (PÁDUA, 2004). Esse mesmo *primer* foi aplicado no presente estudo e apresentou amplificação de 71,4%. Analisando a taxa de transferibilidade de 25 *primers* desenvolvidos para *P. edulis* f. *flavicarpa* em espécies silvestres de *Passiflora* (*P. cincinata*, *P. coccinea*, *P. kermesina*, *P. gardneri*, *P. rubra*, *P. capsulares*, *P. misera*, *P. suberosa*, *P. nitida*, *P. watsoniana*, *P. bahienses*, *P. eichleriana* e *P. setacea*), foi obtido um percentual de amplificação cruzada entre 32 e 76%, sendo que nove das 13 espécies apresentaram amplificação superior a 52% (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008a). Resultados similares foram obtidos em outras espécies de *Passiflora* (*P. foetida* var. *foetida*, *P. galbana*, *P. amaethystina* e *P. palmeri* var. *sublanceolata*) utilizando os mesmos *primers*, apontando taxa de transferência de 40 a 44% (CONCEIÇÃO et al., 2009). A amplificação cruzada, nas espécies *P. gardneri*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. watsoniana* e *P. bahiensis*, utilizando sete pares de *primers* desenhados para *P. alata*, detectou taxa diferenciada de amplificação entre as espécies na ordem de 86%, 86%, 57% e 29%, respectivamente (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008b). A transferibilidade de marcadores polimórficos em plantas é geralmente bem sucedida dentro de gêneros, demonstrando sucesso de quase 60% em dicotiledôneas e 40% em monocotiledôneas (BARBARÁ et al., 2007).

No presente estudo, as condições de PCR precisaram ser otimizadas para cada loco, em virtude da grande variação dos perfis dos produtos amplificados, principalmente devido à presença de bandas inespecíficas e produto de PCR pouco concentrado. Para isso, foi utilizada a estratégia de amplificação conhecida como *touchdown*, na qual a temperatura de anelamento diminui com os ciclos de amplificação da PCR (DON et al., 1991; SENIOR et al., 1996) e se mostrou eficaz, quando aplicadas nos *primers* e nas espécies analisadas. Com a técnica *touchdown*, problemas secundários podem ser evitados, tais como formação de

bandas inespecíficas e inconsistência de temperaturas entre os termocicladores (DON et al., 1991). Essa técnica inicia com ciclos de temperatura de anelamento maior do que aquela que foi padronizada na construção do *primer* e diminui gradualmente até alcançar a temperatura padrão (DON et al., 1991; KORBIE; MATTICK, 2008) e permite o acúmulo de produtos mais específicos no início da reação, os quais servem de molde para amplificações seguintes, diminuindo o surgimento de amplificação não específica (KORBIE; MATTICK, 2008). A maioria dos *primers* utilizados nesse estudo, desenvolvidos a partir das espécies de *P. edulis* f. *flavicarpa* (OLIVEIRA, 2006) e *P. alata* (PÁDUA et al., 2005), foram otimizados utilizando *touchdown*.

Para que fossem obtidas amplificações com bandas nítidas, a temperatura de anelamento de vários *primers* foi atenuada, e isso proporcionou resultados satisfatórios para muitos *primers*. Uma das variáveis que afeta consideravelmente o sucesso de amplificação cruzada entre espécies é a diminuição da temperatura de anelamento durante os ciclos da PCR (PRIMMER et al., 2005). Mutações nas seqüências que flanqueiam as repetições microssatélites têm sido frequentemente observadas entre as espécies, por isso, certo nível de não homologia em espécies que estão sendo transferidas pode ser esperado na região a qual o *primer* anela. Diminuindo-se a temperatura de anelamento, aumentam as chances de amplificação heteróloga (PRIMMER et al., 2005; BARBARÁ et al., 2007)

O sucesso de amplificação se relaciona positivamente com o tamanho do genoma (GARDNER, 2002), provavelmente, porque o aumento do tamanho do genoma (DNA molde) aumenta o número de regiões complementares ao *primer* no processo de PCR. Dentre as espécies estudadas, apenas duas possuem relatos sobre a quantidade de DNA, *P. mucronata* (3,40pg) e *P. gibertii* (3,92pg) (SOUZA et al., 2004), que apresentaram valores médios de transferibilidade (37,5%). Há diferenças em relação ao tamanho do genoma nuclear (2C) entre as diferentes espécies de *Passiflora*; o conteúdo de DNA nuclear (pg) varia de 1,83 em *P. suberosa* a 5,36 pg, em *P. quadrangularis* (SOUZA et al., 2004; 2008), o que pode ter sido um dos fatores que influenciaram as diferentes taxas de transferência observada nas espécies. Em *Gossypium* também foi observado que a variação no tamanho do genoma nuclear entre as espécies *G. arboreum* (2C = 2,0 pg), *G.*

raimondii (2C = 3,8 pg) e *G. hirsutum* (2C = 1,2 pg) influenciou a amplificação de *primers* heterólogos (ENDRIZZI et al., 1985).

A espécie *P. cacaoensis* foi a que apresentou maior taxa de amplificação, quando analisadas amplificações com *primers* obtidos a partir do genoma de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Esse evento pode ser atribuído a algumas semelhanças morfológicas e proximidade genética que *P. cacaoensis* mantém (VIANA, 2009) com a espécie *P. edulis* Sims, por apresentarem altas taxas de cruzabilidade. Espécies da família Meliaceae foram submetidas a testes de amplificação usando *primers* heterólogos de *Swietenia humilis* Zucc, e observou-se que a maior porcentagem de amplificação ocorreu nas espécies pertencentes ao gênero *Swietenia* (WHITE; POWELL, 1997). Outros estudos relacionaram a taxa de amplificação com proximidade taxonômica de algumas espécies (PRIMMER et al., 1996; BALLOUX et al., 1998; PRIMMER et al., 2005; WANG et al., 2005; BARBARÁ et al., 2007).

Apesar da alta taxa de transferência para alguns *primers*, observou-se que os *primers*, A01BP3, A01FP3, A03AP3 (desenvolvidos para *P. alata*) não amplificaram para nenhuma das espécies estudadas, inclusive para o grupo de acessos *P. alata*. A falta de conservação de sítios de anelamento dos *primers* pode ter ocasionado a não amplificação de locos microssatélites, os chamados alelos nulos (GARDNER, 2002), e essa condição é mais observada quando se recorre à transferência de *primers* entre espécies diferentes, o que geralmente afeta, igualmente, todos os indivíduos dentro de uma espécie (BALLOUX et al., 1998). Em germoplasma de *Triticum dicoccon* Schrank foi observado que, de 29 *primers* microssatélites empregados, 10 *primers* resultaram em alelos nulos (TEKLU et al., 2007).

A formação de bandas *stutter*, em alguns locos microssatélites, foi observada, a exemplo o *primer* pe42 e A6FP1, amplificados em *P. mucronata* e *P. alata*, respectivamente. A formação de bandas *stutter* é uma característica inerente aos microssatélites (WALSH et al., 1996; PINTO et al., 2001; GUGERLI et al., 2008), existindo estudos que apenas consideram alelos pertencentes a classe de microssatélites na condição de apresentarem essa particularidade.

A relação entre tamanho esperado e observado não foi mantida para uma grande parte das seqüências microssatélites analisadas, apresentando tamanhos maiores do que o esperado. No genoma de *Zea mays*, esse evento também foi registrado utilizando-se *primers* heterólogos desenvolvidos para *Oriza sativa*, onde

foi observado de 100 a 400pb de diferença nos fragmentos analisados em relação ao tamanho esperado (CARVALHO, 2007). Tais diferenças entre tamanho observado e esperado pode ser devido a eventos mutacionais do tipo *in-del* (inserção – deleção), os quais podem desviar o tamanho da repetição do alelo observado, adquirindo seqüências que apresentam tamanhos fora do padrão para o alelo esperado (BALLOUX et al., 1998; PEAKAL et al., 1998; ANMARKRUD et al., 2008; GUGERLI et al., 2008).

Os locos de microssatélites, quando polimórficos, exibiram poucos alelos em cada grupo de acessos, a maioria apresentando-se monomórficos. Tal fato provavelmente, se deve ao tamanho amostral dos grupos de espécies analisadas, onde das seis espécies analisadas, quatro detêm um total de apenas quatro indivíduos, e até mesmo das características inerentes às populações analisadas, quando se verifica que os acessos de tais espécies possuem o mesmo local de coleta. Além disso, ocorre um decréscimo do polimorfismo quando se analisa amplificação de *primers* heterólogos em espécies com certa distância genética evolutiva, devido, principalmente, à presença de alelos nulos (PRIMMER et al., 2005; PINTO, 2007). Portanto, *primers*, quando polimórficos na espécie alvo, podem não apresentar o mesmo perfil se avaliados em outras espécies.

Nas análises de diversidade genética abordadas no presente estudo, a espécie que apresentou maior número médio de alelos por loco polimórfico (A) foi *P. alata*, podendo esse resultado estar sendo influenciado pela maior quantidade de indivíduos (29 acessos). A ausência de variabilidade intra-específica para o grupo de acessos de *P. glandulosa* pode estar associada ao fato de que foram indivíduos obtidos por doação pessoal na forma de mudas e todos provenientes do mesmo local, se desconhecendo, portanto, o modo como tal coleta foi realizada. Os indivíduos que representam a espécie *P. cacaoensis* foram todos coletados em Serra Bonita, Camacan, BA, a espécie *P. mucronata* é toda representada por acessos coletados na Praia do Aeroporto, Ilhéus, BA, e os indivíduos da espécie *P. gibertii* foram todas obtidas por doações. As informações sobre local de coleta e modo de aquisição do germoplasma são bastante relevantes e podem explicar, assim como o pequeno tamanho amostral, a falta de variabilidade entre esses indivíduos de cada espécie.

Os *primers* utilizados foram satisfatórios para inferir sobre a verdadeira diversidade contida dentro das espécies analisadas do Banco de Germoplasma. Em estudos acerca da diversidade genética em *Caesalpinia echinata* Lam, foram utilizados dez marcadores do tipo microssatélites (MELO, et al., 2007) e em *Phaseolus vulgaris* foram empregados seis *primers* microssatélites (ANGIO et al., 2009). A variabilidade em genótipos de *Oriza sativa* (BRONDANI et al., 2005), foi acessada utilizando-se 25 *primers* microssatélites. Normalmente são empregados pelo menos 10 *primers* nos estudos de diversidade.

O número de alelos por loco e a porcentagem de locos polimórficos (PIC) tem sido empregados como índices de diversidade em populações (CONTE, 2004). Os valores médios de PIC (0,20 – 0,15) apresentados para as populações demonstraram que, para as espécies de *P. alata* e *P. mucronata*, os locos estudados foram altamente informativos, enquanto os analisados nas populações de *P. glandulosa* e *P. cacaoensis* caracterizaram-se como mediamente informativos, e os das populações de *P. cincinnata* e *P. gibertii* como pouco informativos. Esses valores permitem a análise dos *primers* utilizados e a viabilidade do emprego deles em estudos com as mesmas espécies ou até de espécies diferentes de *Passiflora*.

Provavelmente, o tamanho amostral esteja se relacionando diretamente com os valores de PIC obtidos, ou seja, o polimorfismo do loco não foi inteiramente explorado devido à baixa amostragem, podendo estar subestimado. Em germoplasma de *Citrus*, os valores de PIC para 24 marcadores microssatélites em 370 acessos variou de 0,247 a 0,916, com média de 0,625, valores baixos atribuídos a qualidade do marcador utilizado (BARKLEY et al., 2006). Analisando-se dez locos microssatélites em um grupo de 32 variedades de *Glycine soja*, o índice médio de PIC foi 0,747, valor esse considerado baixo, possivelmente, influenciado pela baixa amostragem (GARCIA et al., 2007).

Apesar da baixa diversidade alélica, valores altos de heterozigotos podem ser observados. Para se examinar a organização da diversidade genética entre os acessos de cada espécie, os valores de heterozigosidades médias foram calculados. Neste estudo, a heterozigosidade observada foi maior que a esperada para todas as populações analisadas, portanto, ficou caracterizada a presença de excesso de heterozigotos. Quanto à heterozigosidade, ela tende a ser alta dentro das populações, indicando existir baixa diferenciação entre os indivíduos (HEDERICK,

1999). Tal fato pôde ser observado, pois em algumas espécies, a presença de heterozigotos para um determinado loco foi mantida para quase todos os indivíduos, e, mais uma vez, esse evento pode estar relacionado ao pequeno tamanho amostral das espécies.

O grupo de espécies de *P. mucronata* foi a que exibiu a maior heterozigosidade média observada (0,75), contudo, para todos os locos, exceto para pe07, os quatro acessos exibiram o mesmo perfil de distribuição de alelos. Em populações de germoplasma de *Theobroma grandiflorum*, conservados *in-situ*, detectou-se que a heterozigosidade média esperada (0,458) foi maior que a heterozigosidade média observada (0,369) em todas as populações, acusando excesso de homozigotos. Tal fato, talvez, foi devido à provável existência de um processo endogâmico devido à fragmentação populacional (ALVES, 2002). Do mesmo modo, as heterozigosidades médias esperadas foram maiores que as observadas, em populações de *Cedrela fissilis* Vell., Meliaceae. Tal fato foi atribuído ao efeito Wahlund, ou seja, à distribuição não homogênea de alelos entre indivíduos, devido às diferentes origens dos genótipos, ou, então, à ocorrência de endogamia, ou seja, cruzamentos entre indivíduos aparentados (MENDES, 2009). A heterozigosidade pode ser considerada uma medida de variabilidade genética. Esta medida se refere à quanto da variação é existente na população e como é distribuída por meio de alelos em um determinado loco que é analisado; baixa heterozigosidade significa pouca variabilidade genética (SIQUEIRA, 2008).

O índice de fixação (f ou F_{IS}) mede o excesso ou a deficiência de heterozigotos (MORENO, 2009). Quando o f é positivo, existe uma deficiência de heterozigotos em relação ao esperado no modelo de Hardy-Weinberg (HEDRICK, 2005), que, por sua vez, assume tamanho populacional infinito. Os valores negativos de F_{IS} , observados nesse estudo demonstraram que as populações estão fixando alelos, exceto para a população de *P. cincinnata* que demonstrou um valor de 0,57, que exibiu excesso de homozigotos para os locos avaliados. O F_{IS} é calculado como o índice de fixação de alelos ou coeficiente de endogamia intrapopulacional, devido ao sistema reprodutivo (WRIGHT, 1965; COCKERHAM, 1969). Em estudos sobre a estrutura genética em populações de *Oryza glumaepatula* por meio de marcadores microsatélites, observou-se grande diferenciação genética entre as populações, e este fato foi associado ao tipo de sistema reprodutivo da espécie, que é autógama,

apresentando endogamia intrapopulacional elevada com valores de $F_{IS} = 0,780$ (KARASAWA, 2005).

A polinização é um fator importante a se considerar nas culturas de *Passiflora*, por se tratar de espécies alógamas por excelência. O sistema de auto-incompatibilidade registrado para a maioria das espécies de *Passiflora* (NETTANCURT, 1977; CHANG, 1983; BRUCKNER, 1997) explica, em parte, a alta taxa de heterozigotos presentes em alguns grupos de espécies. O cruzamento entre indivíduos aparentados e a ocorrência de autofecundação contribui expressivamente para as baixas taxas de heterozigotos numa população. Em uma população com sistema de cruzamentos entre indivíduos aparentados, a frequência de homozigotos aumenta e a de heterozigotos é reduzida (HEDRICK, 2005), o contrário é observado em populações não endogâmicas. Vale ressaltar que os valores de F_{IS} podem estar superestimados, devido, talvez, ao tamanho amostral pequeno, o que torna quase impossível capturar todos os genótipos e a verdadeira diversidade inerente a espécie (COLLEVATTI et al., 2004).

As análises feitas sob os resultados obtidos a cerca da variação intraespecífica do grupo de *P. alata* revelaram valores altos de similaridade, sendo que a maioria dos acessos ficou reunido em dois grandes grupos (I e II). Dados similares foram encontrados em germoplasma de *Pearl millet*, alcançando valores de similaridade em torno de 0,45 a 0,92. Os autores concluíram que a maior parte do material estudado é homogêneo, ainda que sejam de lugares diferentes (BUDAK et al., 2003). Valores altos de similaridade representam baixa variação de uma planta para outra. No gênero *Arachis*, acessos pertencentes à coleção de germoplasma exibiram pouca diversidade genética, apresentando valores similares aos encontrados nesse estudo, os autores atribuíram esses valores à pouca quantidade de acessos analisados e a alta cruzabilidade dos mesmos (PALMIERI et al., 2010).

Com o auxílio da representação gráfica dos acessos de *P. alata* nesse estudo, foi possível acessar genótipos duplicados. Os acessos 312 e 53 foram oriundos de doações por Instituições diferentes, mas apresentaram o mesmo genótipo, por não se conhecer o local de coleta desse material. Provavelmente, esses acessos são provenientes do mesmo local ou até mesmo trocas de germoplasma entre as duas Instituições podem ter ocorrido. Na avaliação da diversidade de alguns genótipos de *Theobroma cacao* utilizando *primers*

microssatélites, foram identificados acessos redundantes, devido à presença de híbridos provenientes de um mesmo cruzamento (sementes- irmãs), resultado que contribuiu para melhorar a representação da coleção (IRISH, et al., 2010). No dendrograma verifica-se que os pares de *primers* utilizados foram satisfatórios para definir o padrão dos acessos de *P. alata* contidos no banco de germoplasma avaliado. Em *Vaccinium spp* (mirtilo), apenas três pares de *primers* microssatélites foram suficientes para formar agrupamentos condizentes com a realidade da coleção (ANJOS; SILVA et al., 2010).

Os dados obtidos neste estudo acerca da diversidade genética das espécies do BAG-Passifloras demonstraram que, para a maioria dos acessos de cada grupo de espécie, não se constatou variabilidade intraespecífica. Esse resultado pode ser atribuído a baixa representabilidade das espécies, assim como a mesma procedência da maioria dos acessos dentro de cada espécie, e devido à algumas terem sido provenientes de sementes do mesmo fruto. No caso de coleta, o parentesco entre os indivíduos depende da estruturação genética da espécie na região coletada, e sementes provenientes de uma mesma planta são irmãs, portanto, detentoras de similaridades genéticas (ALLARD, 1970). A baixa amostragem genética provoca a alteração da constituição de genótipos e alelos dos acessos, amostras ou sementes, principalmente por causa do número finito de genitores (WALTER et al., 2007). Contudo, é razoável admitir que qualquer coleção de germoplasma, por maior que seja, é apenas uma pequena amostra da variabilidade total da espécie, e, conseqüentemente, a questão de como amostrar é de grande importância, pois é desejável para os curadores incluir maior variabilidade possível, entretanto sem ultrapassar os limites práticos do manejo (ALLARD, 1970; VENCOVSK et al., 2007).

As espécies avaliadas nesse estudo são silvestres e, portanto, particularidades podem estar associadas à sua baixa representabilidade.. As coletas de material silvestre são inviabilizadas pela carência de dados na literatura sobre aspectos taxonômicos e áreas de distribuição, havendo desde espécies com distribuição localizada ou restrita (endêmicas), até espécies com distribuição extensa, porém essas espécies se encontram separadas, mas, sobretudo, pelo pequeno número de indivíduos que uma população de espécies silvestre naturalmente apresenta (WALTER et al., 2007).

6. CONCLUSÕES

Os altos níveis de transferibilidade dos *primers* não indicaram distância genética acentuada entre as espécies, sendo, portanto, esses *primers*, recomendados para abordagens moleculares em outras espécies do gênero.

O baixo polimorfismo observado para os locos amostrados pode estar associado ao tamanho amostral das espécies analisadas, bem como ao fato de que foram utilizados *primers* heterólogos.

Os parâmetros de diversidade genética apontaram baixa variabilidade genética entre os acessos para a maioria das espécies e, portanto, indicam que mais diversidade necessita ser incluída, por meio de novas expedições para coleta e/ou doações.

Sugere-se racionalizar esta coleção, por meio da substituição de acessos redundantes, com aqueles que podem contribuir para a diversidade genética.

7. REFERÊNCIAS

- ABREU, P. P. **Análises em *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e Híbridos F₁ Ornamentais: Relações Citogenéticas e Caracterização Fisiológica.** 2008. Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA. 172 p, 2008.
- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. Passion Flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica.** v.166, p. 307-315, 2009.
- ADNEW, T.; KETEMA, S.; TEFERA, H.; SRIDHARA, H. Genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.)Trotter] germplasm. **Genetic Resources Crop Evolution.** v.52, p. 891–902, 2005.
- AKAMINE, K. E.; GIROLAMI, G. Problems in fruit set in yellow passion fruit. **Hawaii. Farm. Science.** v. 4, n. 5, p. 3-5, 1957.
- AKPINAR, A.E.; KOÇAL , H.; ERGÜL, A.; KAZAN, K.; ŞELLI, M.E.; BAKIR, M.; ASLANTAŞ, Ş.; KAYMAK, S.; SARIBAŞ, R. SSR-based molecular analysis of economically important Turkish apricot cultivars. **Genetics Molecular Research.** v. 9, n. 1, p. 324-332, 2010.
- ALCANTÁRA NETO, F. **Caracterização genético-molecular de um Banco Ativo de Germplasma de soja.** 2005. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. p. 87, 2005.
- ALCANTARA NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja.** 2001. Tese (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 46p. 2001.
- ALLARD, R.W. Population structure and sampling methods. IN: FRANKEL, O. H.; BENETT, E. **Genetic resources in plants – their exploration and conservation.** Oxford: Blackwell. p. 97-107, 1970.
- ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandifolium* (Wil. Ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos.** 2002. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 159p, 2002.
- AMORIM, E. P.; LESSA, L. S.; LEDO, C. A. S.; AMORIM, V. B. O.; REIS, R. V.; SANTOS-SEREJO, J. A.; OLIVEIRA E SILVA, S. Caracterização agrônômica e molecular de genótipos diplóides melhorados de bananeira. **Revista Brasileira Fruticultura.** v. 31, n. 1, p. 154-161, 2009.

- ANGELICI, C. M.L.C.D.; HOSHINO, A. A.; NÓBILE, P.M.; PALMIERI, D. A.; VALLS, J. F. M.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. Genetic diversity in section Rhizomatosae of the genus *Arachis* (Fabaceae) based on microsatellite markers. **Genetics Molecular Biology**. v. 1, n. 3, p. 79-88, 2008.
- ANGIO, S. A.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; LOGOZZ, G.; DESIDERIO, F.; PAPA, R.; ATTENE, G. Nuclear and chloroplast microsatellite diversity in *Phaseolus vulgaris* L. from Sardinia (Italy). **Molecular Breeding**. v. 23, p. 413–429, 2009.
- ANJOS e SILVA, S. D. dos; ANTUNES, L. E. C.; ANTHONISEN, D. G.; LEMÕES, J. S.; GONÇALVES, E. D. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**.v.30,n.1, 2008.
- ANMARKRUD, J.A.; KLEVEN, O.; BACHMANN, L.; LIFJELD, J.T. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasmy in the hypervariable avian microsatellite locus *HrU10*. **BMC Evolutionary Biology**. 2008.
- ARAUJO, F.P.; SILVA, N.; QUEIROZ, M. A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, n. 3, 2008.
- AUKAR, A. P. A.; LEMOS, E. G. M.; OLIVEIRA, J. C. Genetic Variations Among Passion Fruit Species Using RAPD Markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 24, n. 3, p. 738-740, 2002.
- AZEVEDO, M. A. M. Three new species of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae) from Brazil. **Brittonia**. v. 60, n. 4, p. 310-317, 2008.
- BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry: Cryopreservation of plant germplasm**. Berlin, Springer-Verlag. v.32, p. 3-28, 1995.
- BALLOUX, F.; ECOFFEY, E.; FUMAGALLI, L.; GOUDET, J.; WYTTENBACH, A.; HAUSSER, F. Microsatellite conservation, polymorphism, and GC content in shrews of the genus *Sorex* (Insectivora, Mammalia). **Molecular Biology Evolution**. p. 15, p. 473–475, 1998.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**. v. 11, p. 155-16, 2002.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, MICHAEL F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**. v. 16, p. 3759–3767, 2007.
- BARROS, L. de M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), tipos comum e anão precoce, por meio de**

técnicas multivariadas. 1991. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 256 p, 1991.

BARROSO, G. M. Passifloraceae. In: **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos/ São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 194-197, 1978.

BEEBEE, T. J. C. A comparison of single-sample effective size estimators using empirical toad (*Bufo calamita*) population data: genetic compensation and population size-genetic diversity correlations. **Molecular Ecology.** v. 18, p. 4790–4797, 2009.

BEECHING, J.R.; MARNEY, P.; GAVALDA, M.C.; NOIROT, M.; HAYSON, H.R.; HUGHES, M.A.; CHARRIER, A. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. **Annals Botany.** v. 72, n. 6, p. 515-520, 1993.

BEIDLER J. L.; HILLIARD P. R.; RILL, R. L. Ultrasensitive staining of plant proteins, RNA and DNA on polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** v. 8, p. 93-99, 1982.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARAES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura.** v. 29, p. 124-127, 2007.

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES - SCOTT, M.D. Maracujá - doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura.** v. 25, p. 355 – 356, 2003.

BIANCHI, Valmor João; FACHINELLO, José Carlos; SCHUCH, Márcia Wulff and SANSAVINI, Silveiro. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura.** v. 26, n.3, p. 490-493, 2004.

BICHARA, M.; PINET, I.; SCHUMACHER, S.; FUCHS, R. P. Mechanisms of Dinucleotide Repeat Instability in *Escherichia coli*. **Genetics Society America.** 2000.

BORGES, M.; CEIRO, W; MENESES, S.; AGUILERA, N.; V´AZQUEZ, J.; Z. INFANTE; M. FONSECA. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. **Plant Cell, Tissue, Organ Culture.** v. 76, p. 87–90, 2004.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic.** v. 32, p. 314-331, 1980.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical Applied Genetics.** v. 97, p. 816-827, 1998.

BRUCKNER, C.H. Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro In: SÃO JOSÉ, A.R. et al. **Maracujá: temas selecionados**. Porto Alegre: Cinco continentes. p. 25-46, 1997.

BUDAK, H.; PEDRAZA, F.; CREGAN, P. B.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Development and Utilization of SSRs to Estimate the Degree of Genetic Relationships in a Collection of Pearl Millet Germplasm. **Crop Science**. v. 43, p. 2284–2290. 2003.

CARNEIRO, M. S.; CAMARGO, L. E. A.; VENCOVSKY, R. VIEIRA, M. L. C. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg). **Genome**. v. 45, p. 670-678, 2002.

CARRANZA, J., PÉREZ-GONZÁLEZ, J., MATEOS, C., FERNÁNDEZ-GARCÍA, J L. Parents genetic dissimilarity and offspring sex in a polygynous mammal. **Molecular Ecology**. v. 18, p. 4964–4973, 2009.

CARVALHO, A. Z. de. **Transferibilidade de microssatélite de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) - Universidade Estadual de Pelotas, Pelotas - São Paulo. 54p, 2007.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; CARDOSO-SILVA, C. B.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, M. M.; CORRÊA, R. X. Amplificação cruzada de marcadores microssatélites (SSR) em espécies do gênero *Passiflora*. In: **20º Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Vitória – ES, 2008a.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; CARDOSO-SILVA, C. B.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, M. M.; CORRÊA, RX. Amplificação cruzada de marcadores microssatélites (SSR) entre espécies de Maracujazeiro (*Passifloraceae*; *Passiflora*). In: **54º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, Salvador. Resumos...Salvador: SBG, p.39, 2008b.

CERVI, A. C. A new species of *Passiflora* (*Passifloraceae*) from Minas Gerais, Brazil. **Brittonia**. v. 4, n. 58, p. 385-387, 2006b.

CERVI, A. C. Espécies de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950–2005) na América do Sul e principais publicações brasileiras. **Estudos de Biologia**. v. 27, n.61, p. 19-24, 2005.

CERVI, A. C. Estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. **Fontqueria XLV**, Madrid, 1997.

CERVI, A. C. O gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem**. v. 16, p. 1-5, 2006a.

CHANG, C.C. Breeding of passion fruit. **Plant Breeding Abstracts**. v. 53, n. 3, p. 236, 1983.

CHAO, S.; ZHANG, W.; AKHUNOV, E.; SHERMAN, J.; MA, Y.; LUO, M-C.; DUBCOVSKY, J. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Molecular Breeding**. v. 23, p. 23–33, 2009.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lancaster. v. 23, p. 72-84, 1969.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**. v. 10, p.349-356, 2001.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; SOUZA, M. M.; SILVA, M. M.; BELO, G. O.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CORRÊA, R. X. Cross-amplification of microsatellites and variation among species of *Passiflora*. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTA, II**, 2009, Búzios-RJ. Resumos...Búzios; SBG. p45, 2009.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. Submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**. 2004. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”-Universidade de São Paulo, SP. 124p, 2004.

COPPER, G.; RUBINSZTEIN, D. C.; AMOS, W. Ascertainment bias cannot entirely account for human microsatellites being larger than their chimpanzee homologous. **Human Molecular Genetics**. v. 7, n. 9, p. 1425-1429, 1998.

COSTA, A.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005, p. 475-496.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.19, p.299-306, 2001.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; STENZEL, N. M. C. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, p. 5-10, 2003a.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; VIEIRA, L. G. E. Genetic Diversity in Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Evaluated by RAPD Markers. **Brazilian Archives Biology Technology**. v. 46, n. 4, p. 521-527, 2003b.

- CRUZ, C.D. **Programa Genes: Análise multivariada e simulação**. Editora UFV. Viçosa (MG). 175p, 2006
- CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; FARIA, G. A. **Maracujá: produção e qualidade na Passicultura**. Embrapa, 2004.
- CUNHA, M. C. P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá Produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 104p, 2002
- DAYANANDA, S.; BAWA, K. S.; KESSELI, RICK. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). **American Journal Botany**. v. 84, n. 12, p. 1658–1663, 1997.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora* a review adapted. **Journal Ethnopharmacology**. v. 94, p. 1- 23, 2004.
- DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia**. v. 72, n. 6, p. 698-702, 2001.
- DIAS, L. A. dos S. **Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 1994. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba- SP, 94 p, 1994.
- DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**. v. 3, n. 3, p.119-127, 1991.
- DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**. v. 19, n. 14, 1991.
- DOYLE, J.J; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- ELIAS, M.; MUHLEN, G.S.; McKEY, D.; ROA, A.C.; TOHME, J. Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**. v. 58, p. 242-256, 2004.
- ENDRIZZI, J. E.; TURCOTTE, E. L.; KOHEL, R. J. Genetics, cytogenetics and evolution of *Gossypium*. **Advances Genetics**. v. 23, p. 271–375, 1985.
- ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET J-M. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**. v.11, p.1591–604, 2002.

FAJARDO, D. et al. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**. n. 101, p. 341-347, 1998.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerradosp. 187-210, 2005.

FAO. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome: **FAO**, 336p. 1996.

FERES, J. M., MARTINEZ, M. L. L., MARTINEZ, C. A., MESTRINER, M. A., ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 434–437, 2009.

FERREIRA- RAMOS, R.; LABORDA, P. R.; SANTOS, M. O.; MAYOR, M. S.; MESTRINER, M. A.; SOUZA, A. P.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetic**. 2007a.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de passiflora. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F. **Maracujá, germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 41-51, 2005.

FERREIRA, G. **Estudo da embebição e efeito de fitorreguladores na germinação de sementes de Passifloráceas**. Tese(Doutorado, Pós-Graduação em Agronomia), UNESP, Botucatu-SP. 1998.

FERREIRA, G.; FOGAÇA, L.A.; MORO, E. Germinação de sementes de *Passiflora alata* Dryander (maracujá-doce) submetidas a diferentes tempos de embebição e concentrações de ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**. n. 23, v. 1, p. 160-163, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores genéticos em análise genética**. 2ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 220p, 1996.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G.S.C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. p. 379-420, 2007. IN: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 858p, 2007b.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M.. Passifloraceae. In: KUBITZI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin, Springer. v. IX, p. 270-281, 2007.

- FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proc. R. Soc. Lond.** v. 263, p. 209–215, 1996.
- FISCHER, R. Hybrids and Hibridization. In: ULMER, T.; MACDOUGAL. **Passiflora: Passionflowers of the World**. Timber Press, p. 362-376, 2004.
- FRANK, A.; KUGLER, E.; KING, L. A. **Hybrids and cultivars of Passion Flowers**. 2001.
- FRANKEL, O.H. Genetic conservation: our evolutionary responsibility. **Genetics**. Austin TX. v. 78, p. 53-65, 1974.
- FREITAS, L.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 463p, 2003.
- GAMMA, R. (2004). Passionflowers of the Atlantic Rain Forest of Brazil. In: ULMER, T.; MACDOUGAL. **Passiflora: Passionflowers of the World**. Timber Press, p. 78-80, 2004.
- GANGA, R. M. D.; RUGGIERO C.; LEMOS, E. G. de M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHAGAS, E. A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**. v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.
- GARCIA, A. F.; ALBERINI, J. L.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. Microsatellite molecular markers in the cultivar identification of Brazilian soybean for human consumption. **Crop Breeding Applied Biotechnology**. v. 7, p. 155-164, 2007.
- GARDNER, T. W. J. Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. **Genome**. 2002, v. 45, p. 212–215.
- GOEDERT, C.O. Histórico e avanços em recursos genéticos. 2007. IN: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 23-59, 2007.
- GOEDERT, C.O.; VALLS, J. F. M.; VEIGA, R. F de A. Biodiversidad y recursos genéticos. In: IICA (Montevideo, Uruguay). **El cambio global y el desarrollo tecnológico agropecuario y agroindustrial del Cono Sur: implicâncias para los INIAs y el PROCISUR**. Montevideo: PROCISUR. p. 65-69 ,1997.
- GOODWIN, S. B.; LEE, T. A. J. V. D.; CAVALETTO, J. R.; HEKKERT, B. T. E L.; CHARLES F. C.; KEMA, G. H. J. Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the septoria tritici blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Fungal Genetics Biology**. v. 44, p. 398–414, 2007.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**. v. 122, p. 81–89, 2001.

GUEN, V. L.; GARCIA, D.; MATTOS, C. R. R.; CLÉMENT-DEMANGE A. Evaluation of field resistance to *Microcyclus ulei* of a collection of Amazonian rubber tree (*Hevea brasiliensis*) germplasm. **Crop Breeding Applied Biotechnology**. v. 2, n. 1, p. 141–148, 2002.

GUERRA, M. S. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco. **Revista Brasileira de Genética**. v. 9, p. 21–40, 1986.

GUGERLI, F.; BRODBECK, S.; HOLDEREGGER, R. Insertions–deletions in a microsatellite flanking region may be resolved by variation in stuttering patterns. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 26, p. 255–262, 2008.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristic and electrophoretically detectable variation in plants. **Annual Review Ecology Systematics**. v. 10, p. 173–200, 1979.

HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**. v. 31, n. 1, p. 138–150, 2006.

HAYDEN, H. L.; WILSON, L. M.; COZIENSEN, A. J.; HOWLETT, B. J. Characterization and cross-species amplification of microsatellite loci in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Molecular Ecology Notes**. v. 4, p. 480–481, 2004.

HEATHER G. McGRAY.; DEBRA R. AYRES.; CHRISTINA M. SLOOP.; ALEX KIN LEE. Beta SSR loci cross-amplify in five *Salsola* taxa. **Molecular Ecology Resources**. n. 8, p. 608–61, 2008.

HELLEGREN, H., PRIMMER, C. R., SHELDON, B. C. Microsatellite ‘evolution’: directionality or bias? **Nature**. v. 11, 1995.

HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Marcador **microssatélites na conservação de germoplasma vegetal**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, n. 29, p. 146–150, 2002.

HUANG, X. Q.; BÖRNER, A.; RÖDER, M. S.; GANAL, M. W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. **Theoretical Applied Genetic**. v. 5, p. 699–707, 2002.

INGLEZ DE SOUSA, J. S.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades e cultivo**. Piracicaba: FEALQ, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 179 p. 1997.

IRISH, B. M.; GOENAGA, R.; ZHANG, D.; SCHNELL, R.; STEVE, J.; MOTAMAYOR, J. C. Microsatellite Fingerprinting of the USDA-ARS Tropical Agriculture Research Station Cacao (*Theobroma cacao* L.) Germplasm Collection. **Crop Science**. v. 50, p. 656–667, 2010.

JOANNE, R. R.; ROGER, P. E.; WILLIAM T. B. T.; ROBBIE W.; JIM, P.; ALLAN, B.; JOHN F.; PATRICIA, L.; GEORGE, Y.; WAYNE, P. A retrospective analysis of spring barley germplasm development from 'foundation genotypes' to currently successful cultivars. **Molecular Breeding**. v. 6, p. 553-568, 2000.

JØRGENSEN, P. M.; LAWESSON, J. E.; HOLM-NIELSEN, L. B. A guide to collecting Passionflowers. **Annals Missouri Botanical Garden**. v. 71, n. 4, p. 1172-1174, 1984.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 81-108, 2005.

JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, K. P.; BORGES, R. S.; SILVA, D. G. P.; SANTOS, E. C.; SOUZA, L. S. Desenvolvimento de híbridos ornamentais de maracujazeiro. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. email: junqueira@cpac.embrapa.br.

KAJEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOSKY, R. Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic markers. **Scientia Forestalis**. n. 64, p. 93-107, 2003.

KARASAWA, M.M.G. **Análise da estrutura genética de populações e sistema reprodutivo de *Oryza glaberrima* por meio de microssatélites**. 2005. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP. 91p, 2005.

KILLIP, E. P. The American species of Passifloraceae. **Publ. Field. Mus. Nat. Hist. Bot. Ser.** v. 19, p. 1-613, 1938.

KING, L. A. **Passiflora Cultivars registered from 2004-2009**. 2009.

KING, L. A.; FRANK, A.; KUGLER, E. Hybrids and cultivars of Passion Flowers. **Journal Passiflorunde**. n. 2, 2001.

KORBIE, D.J.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols**. v. 3, p. 1452–1456, 2008.

LEHMAN, T.; HAWLEY, W. A.; COLLINS, F. H. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. **Genetics**. v. 144, p. 1155–116, 1996.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0 (d16c). 2001. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>

LI Y. C.; KOROL AB, F. T.; BEILES, A.; NEVO E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**. v. 11, n. 12, p. 2453-2465, 2002.

LIMA, A. de A. **O cultivo do maracujá**. Cruz das Almas, BA. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999.

LINDENBERG, A. B.; OLESEN, M. O. The fragility of extreme specialization: *Passiflora mixta* and its pollinating hummingbird *Ensifera ensifera*. **Journal Tropical Ecology**. v. 17, p. 323-329, 2001.

LITT, M; LUTY, L. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetics**. v. 44, p. 398-401, 1989.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; CARNEIRO, M. S.; MATTA, F. P.; CAMARGO, L. E. A.; VIEIRA, M. L. C. AFLP linkage analysis and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in yellow passion fruit. **Genome**. V. 49, p. 17-29, 2006.

LOPES, S. C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp, In: SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, p. 19-23, 1994.

LOSS, A. C. C, LEITE, Y. L. R, LOURO, I. D, BATITUCCI, M. C. P. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**. v. 4, p. 55-61, 2006.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review Ecology and Systematics**. v. 15, p.65-95, 1984.

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202p.

MATTOS, F. J. A. **Farmácia Vivas**. 4 ed. Fortaleza: Editora UFC, 267p, 2002.

MCGREGOR, C.E.; LAMBERT, C. A.; GREYLING, M.M.; LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**. v. 113, p. 135-144, 2000.

MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; FILHO, J. de A.; MARTINS, A. L. M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, n. 2, p. 275-278, 2003.

MELO, N. F., CERVI, A. C., GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics Evolution**. v. 226, p. 69-84, 2001.

MELO, S. C. O.; GAIOTTO, F. A.; CUPERTINO, F. B.; CORRÊA, R. X.; REIS, A. M. M.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conservation Genetic**. v. 8, p. 1269–1271, 2007.

MENDES, F. B. G. **Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil**. 2009. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP. 87p, 2009

MORGANTE, M.; HANAFEY, MICHAEL.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature**. v. 30, 2002.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**. v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**. New York, v. 115, p. 335-350, 1987.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington. v.70, p.3321-3323, 1973.

NEI, O. A. **Flower Breeding and Genetics**. p. 3 - 801, 2007.

NETO, F. C. C. Utilização de Passifloraceae na criação de borboletas. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F. **Maracujá, germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 41-51, 2005.

NETTANCURT, D. **Incompatibility in Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag. 230p, 1977.

NEVO, E. Genetic variation in natural population: patterns and theory. **Theoretical Population Biology**. v. 13, p. 294-301, 2006.

NG, K. K. S.; LEE, S. L.; TSUMURA, Y.; UENO, S.; NG, C. H.; LEE, C. T. Expressed sequence tag–simple sequence repeats isolated from *Shorea leprosula*

and their transferability to 36 species within the Dipterocarpaceae. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 393–398, 2009.

NOELLE, A.B.; MIKEAL, L. R.; ROBERT, R. K.; CLAIRE, T. F. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical Applied Genetics**. v. 112, p. 1519-1531, 2006.

NUNES, T. S. & QUEIROZ, L. P. de. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**. v. 6, n. 3, p. 194-226, 2006.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. **Acta Botanica Brasilian**. v. 21, n. 2, p. 499-502, 2007.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**. v. 5, 2005.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics Molecular Biology**. v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, E.J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para a construção e integração de mapas genéticos de maracujá – amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg)**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba São Paulo. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 153 p, 2006.

OLIVEIRA, M. do S. P. **Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açaizeiro**. Tese (Doutorado em Agronomia). Lavras: Universidade Federal de Lavras, 171p, 2005.

OLIVEIRA, M. S. P; SILVA, KAESEL J. D. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, n. 2, 2008 .

OLSON, M.; HOOD L.; CANTOR, C.; BOTSTEIN, D. A common language for the physical mapping of the human genome. **Science**. v. 248, p. 1434-1435, 1989.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; VALLS, J. F. M.; MANSUR, E. Micropropagation and in vitro conservation of wild *Arachis* species. **Plant Cell Tiss Organ Culture**. v. 99, p. 239–249, 2009.

PÁDUA, J.G. **Análises Genéticas de Espécies do Gênero *Passiflora* L. com base em Abordagens Filogenéticas, Morfométricas e em Marcadores**

Microssatélites. 2004. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz- Piracicaba - SP. 120p, 2004.

PÁDUA, J.G., OLIVEIRA, E.J., ZUCCHI, M.I., OLIVEIRA, G.C.X., CAMARGO, L.E.A., VIEIRA, M.L.C. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae) **Molecular Ecology Notes.** v.5, p.863-865, 2005.

PALMIERI, D. A.; BECHARA, M. D.; CURI, R. A.; MONTEIRO, J. P.; VALENTE, S. E. S.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. R. Genetic diversity analysis in the section Caulorrhizae (genus *Arachis*) using microsatellite markers. **Genetics Molecular Biology.** v.33, n. 1, p. 109-118, 2010.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (eds). **Maracujá – germoplasma e melhoramento genético.** Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 457-464, 2005.

PEÑALOZA, A. P. S.; POZZOBON, M. T. Caracterização citogenética de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 307-330, 2007.

PEREIRA, N. E.; SOUZA, M. M. Ensino e pesquisa com recursos genéticos vegetais na UESC. In: ROMÃO, R.L.; RAMOS, S.R.R. **Recursos genéticos vegetais no estado da Bahia.** Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana. UEFS, p. 143-156, 2005.

PINHEIRO, F.; PALMA-SILVA, C.; BARROS, F. de.; COZZOLINO, S. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*. **Genetics Molecular Biology.** n. 2, v. 32, p. 337-339, 2009.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A.P.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Isoenzimas e microssatélites em plantas: aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia e Desenvolvimento.** v. 20, 2001.

PINTO, M. F. F. C. **Caracterização de locos microssatélites em duas espécies de abelhas da região Amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina).** 2007. 66p. Dissertação de mestrado – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A.M.; de CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaífera langsdorfii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis.** v. 65, p. 40-48, 2004.

PRIMMER, C. R.; PAINTER, J. N.; KOSKINEN, M. T.; PALO, J. U.; MERILA, J. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. **Journal Avian Biology.** v. 36, p. 348 – 360, 2005.

- PRIMOT, S.; D'EECKENBRUGGE, C. G.; RIOUX, V.; PÉREZ, J. A. O.; GARCIN, F. Variación morfológica de tres especies de curubas (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus híbridos en el valle del cauca (Colombia). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 27, n. 3, p. 467-471, 2005,
- PRINCE, K. L.; GLENN, T. C.; DEWEY, M. J. Cross-species amplification among peromyscines of new microsatellite DNA loci from the oldfield mouse (*Peromyscus polionotus subgriseus*). **Molecular Ecology Notes**. v. 2, p. 133–136, 2002.
- PRIOLLI, R.H.G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; ARANTES, C.E.; CONTEL, E.P.B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.185-193, 2002.
- QIN, J.; CHEN, W.; GUAN, R.; JIANG, C.; LI, Y.; FU, Y.; LIU, Z.; ZHANG, M.; CHANG, R.; QIU, L. Genetic Contribution of foreign germplasm to elite Chinese soybean (*Glycine max*) cultivars revealed by SSR markers. **Chinese Science Bulletin**. v. 51, n. 9, p. 1078 - 1084, 2006.
- QUEIROZ, M. A.; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos vegetais para o agronegócio. IN: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 61-108, 1997.
- RAHMAN, M, H.; JAQUISH, B.; KHASA, P.D. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with Silver and Sybr stains. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 18, p. 339–348, 2000.
- RALLO, P.; DORADO, G.; MARTÍN, A. Developmet of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**. v. 101, p. 984-989, 2000.
- RUSHING, F. **Tough plants for southern gardens: low care, no care, tried and true winners**. Cool Springs Press, Nashville, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p, 1989.
- SÁNCHEZ, I.; ANGEL, F.; GRUM, M.; DUQUE, M. C.; LOBO, M.; TOHME, J.; ROCA, W. Variability of chloroplast DNA in the genus *Passiflora* L. **Euphytica**. v. 106, p. 15–26, 1999.
- SANTOS, CARLOS ANTONIO FERNANDES; LIMA NETO, FRANCISCO PINHEIRO; RODRIGUES, MARCIENE AMORIM.; COSTA, JOÃO GOMES. Similaridade genética de acessos de mangueira de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, n.3, 2008.

SANTOS, E. A. **Melhoramento de Passifloras para Ornamentação Utilizando *Passiflora palmeri* var. *sublanceolata*, *Passiflora foetida* var. *foetida* e Híbridos F₁ Ornamentais: Confirmação via RAPD, Parâmetros Genéticos e Efeitos do Sombreamento.** 2008. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 113 p, 2008.

SANTOS, I, R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: alternativa para conservação a longo prazo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. n. 20, 2001.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Criopreservação de germoplasma vegetal.. 2007. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais.** Brasília: Embrapa. p. 545-567, 2007.

SARIKAMIŞ, G.; YANMAZ, R.; ERMIŞ, S.; BAKIR, M.; YÜKSEL, C. Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. **Genetics Molecular Research.** v. 9, n. , p. 591-600, 2010.

SCARIOT, A. O.; SEVILHA, A. C. Conservação *in situ* de recursos genéticos vegetais. IN: NASS, In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais.** Brasília: Embrapa. p. 473-502, 2007.

SCHOEN, D.J.; BOWN, A. H. D. The conservation of wild plant species in seed in banks. **Bioscience.** Washington, DC. v. 51, p. 960-965, 2001.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; SILVA, G. J.; FRANCO, F. DE A.; MARCHIORO, V. S..Genetic variability in Brazilian wheat cultivars assessed by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology.** v. 32, n. 3, p. 557-563, 2009.

SEGURA, S.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; BOHORQUEZ, A.; OLLITRAULT, P.; TOHME, J. An AFLP diversity study of the genus *Passiflora* focusing on subgenus *Tacsonia*. **Genetic Resources Crop Evolution.** p. 1-13, 2002.

SHINDE, D.; LAI, Y.; SUN, F.; ARNHEIM, N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analyses: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. **Nucleic Acids Research.** v. 31, p. 974-980, 2003.

SHINDE, D.; LAI, Y.; SUN, F.; ARNHEIM, N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. **Nucleic Acids Research.** v. 31, n. 3, 2003.

SILVA, D. B.; WETZEL, M.M.V.S.; SALOMÃO, A.N.; FAID, M.G.R. Conservação de germoplasma semente em longo prazo. 2007. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais.** Brasília: Embrapa. p. 441-447, 2007.

SIQUEIRA, M. V. B. M. **Diversidade genética de etnovarietadesde mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em áreas de Cerrado no Estado do Mato Grosso do Sul e de variedades comerciais por meio de marcadores microssatélites.** 2008.

Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, SP. 89p, 2008.

SOUZA, J. S. I.; MELLETTI, L. M. M. **Maracujá: Espécies, variedades cultivo**. Piracicaba: FEALQ. 1997.

SOUZA, M. M. Ações de pesquisa para a utilização de Passifloras silvestres como planta ornamentais. In: **2º Workshop de Recursos Genéticos Vegetais**, Cruz das Almas-BA, v. 18, 2006a.

SOUZA, M. M. Importância da caracterização de germoplasma de Passifloras para Programas de Melhoramento. **I Workshop sobre Pesquisas com Passifloras na UESC**. Ilhéus-BA. 2007.

SOUZA, M. M.; PALOMINO, G.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; VIANA, A. P.; SILVA, L. C. AND SUDRÉ, C. P. Variação interespecífica do tamanho do genoma em *Passiflora* spp. (PASSIFLORACEAE). In: **2º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS**, SBMP, Livro eletrônico, 297-302, 2003b.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; SILVA, L. C.; REIS, D. S. S. AND SUDRÉ, C. P. Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. **Cytologia**. n. 68, p. 165-171, 2003a.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, M. C. Cytogenetics studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): A review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives Biology Technology**. n. 2, v. 51, p. 247-258, 2008.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T.N. Passifloras como plantas ornamentais. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULURA E PLANTAS ORNAMENTAIS**. Universidade Federal de Lavras. Lavras: SBFPO. p24, 2003c.

SOUZA, M.M.; PALOMINO, G.; PEREIRA, T.N.S.P.; PEREIRA, M.G.; VIANA, A.P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**. v. 141, p. 31-38, 2004.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T. N. S.; SILVA, L. C.; REIS, D. S. S.; SUDRÉ, C. P. Karyotype of six *Passiflora* species collected in the State of the Rio de Janeiro. **Cytologia**. v. 8, n. 2, p. 165-171, 2003c.

SOUZA, V. A. B. de; CARVALHO, M. G. de; SANTOS, K. S.; FERREIRA, C. da S. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, n. 4, 2008.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seeds: a preliminary guide to the practical preservation of seed germplasm in liquid nitrogen. IN: FAO. Internacional Board for

Plant Genetic Resources. Advisory Committee on Seed Storage. Reporter of the second meeting. **Rome**, 1984. p. 8-27.

STEEVES, T. E.; HALE, M. L.; GEMMELL, N. J. Development of polymorphic microsatellite markers for the New Zealand black stilt (*Himantopus novaezelandiae*) and cross-amplification in the pied stilt (*Himantopus himantopus leucocephalus*). **Molecular Ecology Resources**. v. 8, p. 1105–1107, 2008.

STUSHNOFF, C. Cryopreservation of fruit crop genetic resources – implications for maintenance and diversity during conservation. **HortScience**. v. 26, n. 5, p. 518-522, 1991.

SUN, X.; BAI, G.; CARVE, B. F. Molecular markers for wheat leaf rust resistance gene Lr41. **Molecular Breeding**. v. 23, p. 311–321, 2009.

SUTHERLAND, G. R.; RICHARDS, R. I. Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA. v. 92, p. 3636–3641, 1995.

TANKSLEY, S.D.; McCOUCH, S. Seed banks and markers molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. **Science**. v. 277, p. 1063-1066, 1997.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TAY, D. Herbaceous ornamental plant germplasm conservation and use: Theoretical and practical treatments. IN: NEI, O. A. **Flower Breeding Genetics**. p. 113–175, 2007.

TAZIMA, Z. H.; NEVES, C. S. V. J.; STENZEL, N. M. C.; YADA, I. . U.; LEITE JUNIOR, R. P. Produção e qualidade de frutos de cultivares de laranja- doce no norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 31, n. 2, p. 474-479, 2009.

TEIXEIRA, C. G. MOLÉSTIAS E PRAGAS. **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas, p. 267, 1994.

TEKLU, Y.; HAMMER, K.; RÖDER, M.S. Simple sequence repeats marker polymorphism in emmer wheat (*Triticum dicoccon* Schrank): Analysis of genetic diversity and differentiation. **Genetic Resources Crop Evolution**. v. 54, p. 543–554, 2007.

TRIVEDI, S. **Comparison of simple sequence repeats in 19 Archaea**. Genetics Molecular Research. v. 5, n.4, p.741-772 , 2006.

ULMER, T.; MACDOUGAL. **Passiflora: Passionflowers of the World**. Timber Press, p. 68-72, 2004.

- UPADHYAYA, H. D.; GOWDA, C. L. L.; REDDY, K. N.; SUBE SINGH. Augmenting the Pearl Millet Core Collection for Enhancing Germplasm Utilization in Crop Improvement. **Crop Science**, v. 4, p. 573–580, 2009.
- VALLS, J.F.M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa. p. 281-305, 2007.
- VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa- Cenargen, 62p, 1996.
- VANDERPLANK, J. **Passion Flowers**, 2. ed. Cambridge: The MIT Press. 224p, 1996.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge: The MIT Press. 224p, 2000.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge: The MIT Press. 224p, 2006.
- VANDERPLANK, R. J. R. More wonderful cultivars. **Passiflora**. v. 12, p. 1–8, 2002.
- VARASSIN, I. G.; TRIGO, J. R.; SAZIMA, M. The role of néctar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. **Botanical Journal Linnean Society**. v. 136, p. 139-152, 2001.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnology**. n. 1, v. 23, 2005.
- VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**. v.137, n.1, p.63- 72, 2004.
- VENCOVSK, R.; NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A.J.F. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 231-278, 2007.
- VIANA, A. J. C. **Delimitação entre as espécies *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora* sp nativa da Bahia com base em características citogenéticas, moleculares e morfológicas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA. 109 p, 2009.
- VIANA, A. J. C.; CRUZ, T. V.; FRANCO, M. A. M.; BELO, G. O.; FONSECA, T. W. S.; JÚNIOR, G. G. S.; ROZA, A. F.; NASCIMENTO, R. R.; SOUZA, M. M. Banco Ativo de Germoplasma de Passifloras da UESC. Anais do 11º Seminário de Iniciação Científica da UESC, Ilhéus – BA, 2005.
- VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. **Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n. 3, 2003.

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M.; JÚNIOR, A. T. A. Genetic diversity in yellow passion fruit populations. **Crop Breeding Applied Biotechnology**. v. 6, p. 87-94, 2006.

VIANA, V. M. Conservação da biodiversidade de fragmentos tropicais em paisagens intensamente cultivadas. In: **Abordagens interdisciplinares para a conservação da biodiversidade e dinâmica do uso da terra no novo mundo**. Gainesville: Conservation International do Brasil, Universidade Federal de Minas Gerais, University of Florida. p. 135-154, 1995.

VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAMANATHA, R. V. Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: The role of biotechnology. **Proceedings**. p. 121-128. 2005.

VIEIRA, E. S. N.; SCHUSTER, I.; SILVA, R. B. da.; OLIVEIRA, M. A. R. de. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microsatélites em gel de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.44, n.11, pp. 1460-1466, 2009.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. p. 78, 1997.

VITTA, F. A.; BERNACCI, C. A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis* (Passifloceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. **Brittonia**. v. 56, p. 89-95, 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN, de LEE T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WALSH, P.S.; FILDES, N.J.; REYNOLDS, R. Sequence analyses and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. **Nucleic Acids Research**. v.24, n.24, p. 2807-2812, 1996.

WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B.; BIANCHETTI, L. B. Princípios de sobre a coleta de germoplasma vegetal. IN: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 193-224, 2007.

WANG, X.; WADL, P. A.; RINEHART, T. A.; SCHEZER, B. E.; WINDHAM, M. T.; SPIERS, J. M.; JOHNSON, D. H.; TRIGIANO, R.N. A linkage map for Xowering dogwood (*Cornus xorida* L.) based on microsatellite markers. **Euphytica**. v.165, p.165–175, 2009.

WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; YU J.-K.; DEAN, R. E.; NEWMAN, M. L.; SORRELLS, M. E.; PEDERSON, G. A. Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation. **Plant Genetic Resources**. v. 3, p. 45–57, 2005.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval**. 1992. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2009.

WEBBER J. L.; MAY P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal Human Genetics**. v. 44, p. 388-396, 1989.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C. C. Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, n. 38, p. 1358–1370, 1984.

WENDEL, J. F., and R. C. CRONN. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. **Advances Agronomy** (in press). 2002.

WETZEL, M. M. V. S.; FERREIRA, F. R. Sistema de curadorias de germoplasma. 2007. In: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 121-141, 2007.

WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**. v. 6, p. 1195–1197, 1997.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.;TINGEY S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 8, p. 6531-6535, 1990.

WONG, H.L.; YEOH. H.H.; LIM, S.H. Customization of AFLP analysis for cassava varietal identification. **Phytochemistry**. v. 50, n.6, p. 919, 1999.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems mating. **Evolution**. v. 19, p.395-420, 1965.

XU, X.; KAWASAKI, S.; FUJIMURA, T.; WANG, C. A protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 23, p. 291–295, 2005.

ZACARIAS, A.M.; BOTHA, A.M.; LABUSCHAGNE, M.T.; BENESI, I.R.M. Characterisation and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm from Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica**. v. 138, p. 49-53, 2004.

ZALDIVAR, M.E.; ROCHA, O.J.; AGUILAR, G.; CASTRO, L.; CASTRO, E.; BARRANTES. R. Genetic variation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivated by Chibcan Amerindians of Costa Rica. **Economic Botany**. v. 52, p. 204-213, 2004.

ZAMBERLAN, P. M. **Filogenia de Passiflora L. (Passifloraceae): questões infra-subgenéricas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, PR. 36p. 2007.

ZHU, Y.; STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genetic Research**. v. 76, p. 227- 236, 2000.